

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Dpto. de Biología Molecular

Análisis del sistema de partición
activa del plásmido pSM19035 de
Streptococcus pyogenes

Tesis Doctoral
Florenxia Pratto

Memoria presentada por Florencia Pratto para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

El trabajo ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la dirección del Prof. Juan Carlos Alonso Navarro y la tutela de la Dra. Sylvia Ayora Hirsch.

ABREVIATURAS	1
SUMMARY	2
 <u>INTRODUCCIÓN</u>	
1. El plásmido pSM19035	3
2. Sistemas de estabilidad plasmídica	6
2.1. Partición Activa	7
2.1.1. Organización de los módulos de partición	7
2.1.2. Sistemas de partición activa plasmídicos	9
2.1.2.1. <i>Sistemas tipo Ia: plásmidos P1 y F</i>	9
2.1.2.2. <i>Sistemas tipo Ib: Plásmidos pB171 y TP228</i>	11
2.1.2.3. <i>Sistema tipo II: Plásmido R1 y los filamentos tipo actina</i>	12
2.1.3. Sistemas de partición activa en cromosomas bacterianos	13
2.1.4. El sistema de partición activa del plásmido pSM19035	14
3. La proteína ω_2 es el regulador del plásmido pSM19035	15
3.1. Características y función de la proteína ω_2	15
3.2. Estructura de ω_2 en solución	18
 <u>OBJETIVOS</u>	20
 <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	
1. Materiales	21
1.1. Cepas	21
1.2. Reactivos y materiales	21
2. Métodos	23
2.1. Manipulación de células	23
2.1.2. Obtención de células competentes	23
2.1.3. Transformación Bacteriana	24
2.2. Manipulación del ADN	24
2.2.1. Purificación y cuantificación del ADN	24
2.2.2. Plásmidos	24
2.2.3. Marcaje radiactivo de fragmentos de ADN	27
2.2.3.1. <i>Marcaje de fragmentos con extremos 5' protuberantes</i>	27
2.2.3.2. <i>Obtención y purificación de los fragmentos de ADN utilizados para los distintos ensayos de interacción proteína-ADN</i>	27
a) <i>Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN mayores de 100 pb</i>	27
b) <i>Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN menores de 100 pb</i>	28
2.2.4. Mutagénesis dirigida	29
2.3. Obtención y estudio de proteínas	29
2.3.1. Sobreproducción de proteínas	29
2.3.2. Purificación de proteínas	30
2.3.2.1. <i>Purificación de las proteínas ω_2, $\omega_2\Delta 8$, $\omega_2\Delta 18$, $\omega_2\Delta 19$, $\omega_2\Delta 25$</i>	30
2.3.2.2. <i>Purificación de δ_2, $(\delta\text{-His}_6)_2$ y $(\delta\text{K36A-His}_6)_2$</i>	31

2.3.3. Ensayo de unión covalente entre proteínas	32
2.4. Ensayos bioquímicos	32
2.4.1. Medida de interacciones proteína-ADN	32
2.4.1.1. Ensayos de retraso en gel	32
2.4.1.2. Ensayos de protección a DNasa I	33
2.4.1.3. Ensayos de protección al ataque de agentes químicos	33
2.4.2. Medida de la actividad ATPasa	34
2.4.3. Dispersión de la luz	34
2.4.4. Ensayos de centrifugación	34
2.5. Ensayos <i>in vivo</i>	35
2.5.1. Ensayos de estabilidad del plásmido	35
2.5.2. Medida de la actividad β -Galactosidasa	35
2.6. Microscopía	36
2.6.1. Microscopía de fluorescencia	36
2.6.2. Microscopía electrónica	37

RESULTADOS

1. Interacción de la proteína ω_2 con el ADN	38
1.1. La proteína ω_2 se une a repeticiones en diferente orientación	38
1.2. La proteína ω_2 protege grandes segmentos de ADN de la digestión por DNasa I	39
1.3. Reconocimiento selectivo de la secuencia de ADN	41
1.4. La proteína ω_2 interacciona con la región central 5'-WATCACW-3'	42
1.5. La proteína ω_2 se une con menor afinidad a repeticiones 5'- ^A /TATCAC ^A /T-3' espaciadas entre sí	44
2. Construcción y caracterización de variantes de ω_2	44
2.1. Aminoácidos relevantes en su interacción con ADN	44
2.2. Actividad <i>in vivo</i> de las variantes de la proteína ω_2	46
2.3. Análisis <i>in vitro</i> de las variantes de la proteína ω_2	47
2.3.1. Estado oligomérico de las proteínas mutadas	47
2.3.2. Unión a ADN	48
2.3.3. Conformación y estabilidad térmica de la proteína ω_2 y sus variantes	50
3. Determinación de la estructura de ω_2 en complejo con repeticiones en forma directa e inversa	51
3.1. Interacciones ADN-proteína	52
3.2. Comparación de $[\omega_2\Delta 19]_2$ -($\rightarrow\rightarrow$) y $[\omega_2\Delta 19]_2$ -($\rightarrow\leftarrow$)	54
3.3. Conformación del ADN libre y unido a $\omega_2\Delta 19$	55
3.4. Interacciones dímero-dímero	55
3.4.1. Construcción de un mutante en el residuo His38	56
4. Sistema de partición activa	57
4.1. Alineamiento de secuencias	57
4.2. Análisis <i>in vitro</i>	59

4.2.1. Clonación, purificación y determinación de su estado en solución	59
4.2.2. La proteína δ tiene una débil actividad ATPasa estimulada por ω_2 unida a ADN con la secuencia <i>parS</i>	60
4.2.3. Unión de ω_2 y δ_2 al ADN	62
4.2.4. Polimerización de la proteína δ_2 en presencia de ω_2 y <i>parS</i>	65
4.2.4.1. ω_2 y no $\omega_2\Delta 19$, coprecipita con δ_2	65
4.2.4.2. La proteína δ_2 polimeriza sobre el ADN en presencia de ATP y ω_2	66
4.2.5. La presencia de δ_2 y ω_2 promueve el apareamiento de plásmidos por los sitios centroméricos	67
4.3. Análisis <i>in vivo</i>	70
4.3.1. Las proteína ω_2 y δ_2 son necesarias para la segregación plasmídica	71
4.3.2. Localización subcelular de la proteína δ_2	72
5. Estructura de δ_2	75
5.1. Descripción de la estructura	75
5.2. El sitio de unión a nucleótido	77
 <u>DISCUSIÓN</u>	
Estabilidad del plásmido pSM19035	78
Unión de ω_2 al ADN	78
Caracterización de variantes de la proteína ω_2	80
Estructura de ω_2 unida al ADN y comparación con otras proteínas de la familia RHH	81
Las proteínas δ_2 y ω_2 , junto con <i>parS</i> componen un sistema de partición activa	84
Análisis <i>in vivo</i>	85
Análisis <i>in vitro</i>	86
Formación de estructuras apareadas	88
Modelos del mecanismo de acción de los sistemas de partición activa	89
 <u>CONCLUSIONES</u>	
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	95
<u>ANEXO</u>	101

Índice de tablas y figuras

Tablas

Tabla 1.	Comparación entre los diversos sitios de partición	9
Tabla 2.	Cepas	21
Tabla 3.	Productos	21
Tabla 4.	Oligonucleótidos	22
Tabla 5.	Plásmidos	24
Tabla 6.	Unión de ω_2 a repeticiones en diferente número y orientación	39
Tabla 7.	Unión de ω_2 al ADN consenso con una mutación	41
Tabla 8.	Unión de ω_2 al repeticiones espaciadas estudiado por experimentos de retraso en gel.	44
Tabla 9.	Expresión <i>in vivo</i> del promotor de $\delta (P_\delta)$ fusionado a <i>lacZ</i> en presencia de las variantes de ω	46
Tabla 10.	Concentración de las variantes de ω_2 requerida para unir el 50% del ADN consenso	49
Tabla 11.	Expresión <i>in vivo</i> del promotor de $\delta (P_\delta)$ fusionado a <i>lacZ</i> en presencia de las variantes de ω	57
Tabla 12.	Unión de la proteína δ_2 a ADN.	62
Tabla 13.	Frecuencia de pérdida de plásmidos	70
Tabla 14.	Frecuencia de pérdida de plásmidos II	74

Figura 1.	Mapa físico del plásmido pSM19035	4
Figura 2.	Regiones Rep, SegA y SegB del plásmido pSM19035	5
Figura 3.	Organización genética de los sitios de partición activa	8
Figura 4.	Organización de los sitios de partición de los plásmidos F, P1 y R1	10
Figura 5.	Comparación de las secuencias de los sitios de unión de ω_2 y de las secuencias de las proteínas ω y ω_2	16
Figura 6.	Estructura de ω_2	18
Figura 7.	Interacción de la proteína ω_2 con ADN conteniendo de dos a cuatro repeticiones en diferente orientación	38
Figura 8.	Experimento de protección a DNasa I con los complejos ω_2 -ADN	40
Figura 9.	Ensayo de protección del ADN al ataque de agentes químicos (radical hidroxilo) utilizando ω_2 y ADN con cuatro repeticiones directas.	42
Figura 10.	Ensayo de protección al ataque de radical hidroxilo de los complejos de ω_2 con ADN con tres repeticiones ($\rightarrow_2\leftarrow$).	43
Figura 11.	Localización del residuo Thr29 en la estructura de ω_2 .	45
Figura 12.	Comparación de las secuencias de las variantes de la proteína ω_2 .	45
Figura 13.	Oligomerización de las proteína ω_2 y ω_2 T29A	48
Figura 14.	Interacción de las variantes de ω_2 con el ADN	49
Figura 15.	Ensayo de protección a la digestión por DNasa I con las variantes de ω_2	50
Figura 16.	Espectro de Dicroísmo Circular de las variantes de ω_2	51
Figura 17.	Esquema del ADN utilizado para la cocrystalización y organización de los complejos en el cristal.	52
Figura 18.	Esquema de las interacciones ADN- $\omega_2\Delta 19$	53
Figura 19.	Estructura de $[\omega_2\Delta 19]_2$ -($\rightarrow\rightarrow$) y en $[\omega_2\Delta 19]_2$ -($\rightarrow\leftarrow$)	54
Figura 20.	Interacciones dímero-dímero	56
Figura 21.	Alineamiento de secuencias y estructura secundaria de proteínas de la familia ParA/MinD	58
Figura 22.	Dimerización de las proteínas δ_2 y δ_2 K36A	59

Figura 23.	Actividad ATPasa de la proteína δ_2	60
Figura 24.	Actividad ATPasa de la proteína δ_2 en presencia de las variantes de ω_2	61
Figura 25.	La proteína ω_2 desplaza a δ_2 del ADN	63
Figura 26.	Ensayo de protección a Dnasa I con los complejos ω_2 •DNA o ω_2 • δ_2 •DNA	64
Figura 27.	Ensayo de precipitación.	65
Figura 28.	La proteína $(\delta$ •ATP) $_2$ forma filamentos sobre el ADN.	66
Figura 29.	Polimerización de la proteína δ_2	66
Figura 30.	Formación de plásmidos apareados en presencia de δ_2 y ω_2	68
Figura 31.	Micrografía electrónica de los complejos ADN•proteína	69
Figura 32.	Localización subcelular de δ_2 en visualizada como una fusión a GFP	71
Figura 33.	Localización subcelular de δ_2 en presencia de ω_2 o sus variantes	73
Figura 34.	Estructura de la proteína δ_2 en complejo con ATP γ S•Mg $^{2+}$	76
Figura 35.	Modelos de ω_2 unida al ADN	84
Figura 36.	Modelo del mecanismo de acción del sistema de partición activa del plásmido pSM19035	91

A: adenina
Aa: aminoácidos
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNcd: ADN cadena doble
ATP: Adenosina-5'-trifosfato
ADP: Adenosina-5'-monofosfato
ARN: ácido ribonucleico
C: citosina
Cm: Cloranfenicol
dPAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DLS: dispersión dinámica de la luz (del inglés *dynamic light scattering*)
DNasa I: Desoxirribonucleasa I
dNTPs: 2'-desoxirribonucleósidos-5'-trifosfato
DSS: Ácido subérico
G: guanina
His: histidina
HTH: del inglés *helix turn helix*, hélice-giro-hélice, dominio de unión al ADN
IPTG: isopropyl β -D-thiogalactósido
Kb: kilo pares de bases
LB: Medio de cultivo Luria Bertani
Ni-NTA: matriz de níquel
ndPAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante
nt: nucleótido
orf: marco abierto de lectura
pb: pares de bases
PEI: polietilénimina
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *polymerase chain reaction*)
RHH: del inglés *ribbon helix helix*, hoja-hélice-hélice, dominio de unión al ADN
rpm: revoluciones por minuto
SA: sulfato amónico
SDS: dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
TBE: Tris Borato EDTA
TAE: Tris Acetato EDTA

Summary

pSM19035-encoded ω protein forms a dimer (ω_2) that binds to a set of 7-base pair (bp) repeats with sequence 5'-WATCACW-3' either in direct or inverse orientation. Upon binding to its cognate sites, ω_2 regulates transcription of genes required for copy number control and stable inheritance of plasmids, and promotes accurate plasmid segregation. Protein ω_2 binds poorly to one heptad but the affinity to DNA increases with two and more unspaced heptads. Spacing of two directly or inversely oriented heptads by 1- to 7-bp reduces the affinity of the protein for its cognate target site. The binding affinity of ω_2 for two directly repeated heptads was severely reduced if one of the base pairs of the 5'-ATCAC-3' core sequence of one of the heptads was individually substituted by any other base pair. Hydroxyl radical footprinting shows a protection pattern at the 5'-AT-3' at one strand and at the 5'-GTG-3' in the other strand. These data show that each heptad defines an operator half-site and that protein ω_2 binds to both palindromic and non-palindromic sites with similar efficiency. The crystal structure of ω_2 variant $\omega_2\Delta 19$ in complex with DNA containing two direct or two inverted repeats in the head-to-head orientation was solved. The findings confirmed those obtained by the means of biochemical assays: protein ω_2 is able to interact with the core DNA in order to bind with same affinity to both sites.

The low-copy number pSM19035 is more stable than expected for random segregation. Its accurate partitioning during cell division requires, among other mechanisms, the homodimeric proteins δ_2 (ParA) and ω_2 (ParB) and *cis*-acting *parS* (DNA) sites. Protein δ_2 co-localizes with the nucleoid, and in the presence of ω_2 and *parS*, protein δ_2 forms organized structures and appears to oscillate between the nucleoid and the cell poles. The structure of δ_2 , which shares structural identity with Soj and MinD, was solved in complex with ATP γ S. Protein δ_2 has poor ATPase activity and binds non-specifically to DNA. At low molar ω_2 : δ_2 ratios and in presence of *parS* and ATP, we observed plasmid pairing and the stimulation of δ_2 ATPase activity, at higher ω_2 : δ_2 ratios we observed nucleoprotein filaments formation by δ_2 . All these activities are abolished when protein ω_2 is substituted by N-terminally truncated $\omega_2\Delta N19$ or *parS*-binding deficient ω_2T29A . We propose that in presence of *parS* and ATP, ω_2 modulates δ_2 activities and triggers the switch for timely and accurate separation of plasmid molecules.

∴ INTRODUCCIÓN ∴

La duplicación y la transmisión de la información genética del progenitor a las células hijas es un atributo fundamental de los seres vivos. Los genomas que se encuentran en copia única o en bajo número de copia se encuentran obligados a utilizar sistemas de partición activa para asegurar que cada célula hija reciba una copia. Los elementos extracromosomales (plásmidos, virus) son de gran utilidad para estudiar estos sistemas complejos. Nuestro interés se centra en poder comprender los mecanismos que garanticen que cada célula hija reciba una copia del material genético utilizando como modelo experimental un plásmido bacteriano ya que sus sistemas de partición son simples en organización pero a su vez eficientes en su función y el hospedador menos complejo que una célula eucariota.

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosomales no esenciales para la supervivencia del hospedador pero que frecuentemente le confieren ventajas selectivas como resistencia a antibióticos o la presencia de vías metabólicas útiles en ciertas condiciones ambientales. Los plásmidos replican de manera autónoma y controlada, pueden transmitirse por sí mismos o ser movilizados por otro replicón. Se cree que las bacterias Gram positivas con bajo contenido de dG + dC en su ADN (también llamadas firmicutes) son las más antiguas (Ciccarelli y col., 2006; Koch, 2003) y por ello esperamos que sus plásmidos tengan sistemas más robustos. Se los puede dividir en dos grandes grupos: a) de pequeño tamaño y alto número de copias y b) de gran tamaño y bajo número de copias. Los plásmidos del primer grupo replican por el mecanismo de círculo rodante, generando la rotura de una de las hebras y la acumulación de un intermedio circular de simple hebra de ADN. En estos plásmidos la segregación es al azar y se garantiza que cada célula hija reciba al menos una copia por el alto número de moléculas a distribuir. Los plásmidos del segundo grupo replican su ADN por el modo theta (llamado así porque sus intermediarios de replicación visualizados por microscopia electrónica se asemejan a esa letra griega) sin rotura en el ADN. Estos plásmidos requieren sistemas específicos para mantenerse en la célula. El prototipo de este último grupo es el plásmido pSM19035 (Brantl y col., 1990; Ceglowski y col., 1993a; Ceglowski y col., 1993b).

1. El plásmido pSM19035

El plásmido pSM19035 tiene un tamaño de 28,9 Kb y pertenece a la familia de plásmidos *inc18*, junto con los plásmidos pAM β 1 y pIP501. Fue originariamente aislado de células de *Streptococcus pyogenes* y a pesar de sus repeticiones internas (el 80 % de su genoma esta

repetido e invertido) es capaz de propagarse de manera estable en un gran número (al menos 18 de las 21 especies) de firmicutes sin perder información genética (lo que se conoce como estabilidad estructural) (Figura 1) (Brantl y col., 1990; Ceglowski y col., 1993a; Ceglowski y col., 1993b).

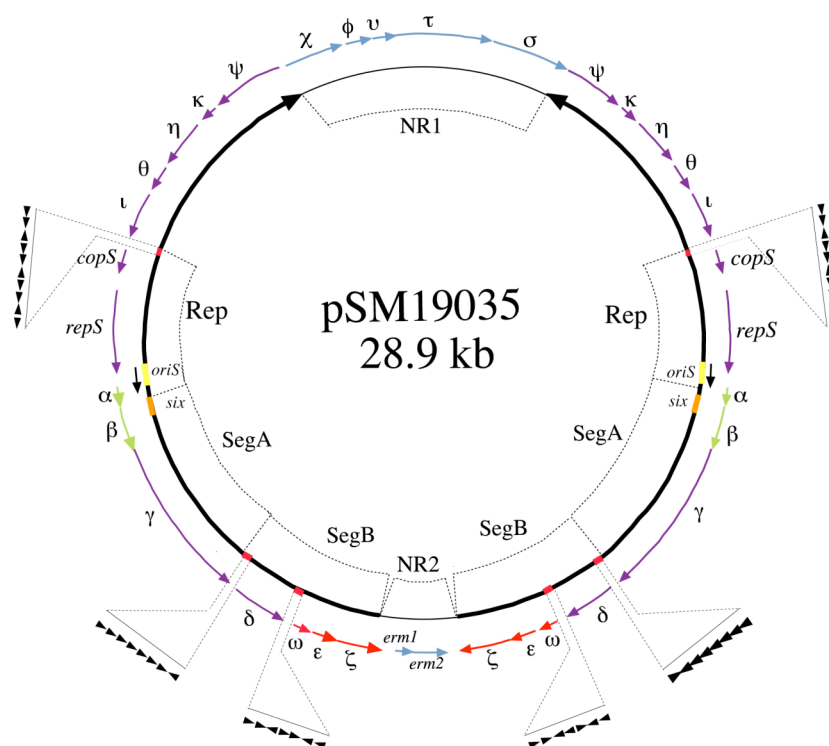


Figura 1. Mapa físico del plásmido pSM19035

Las secuencias duplicadas están indicadas por una línea gruesa y la cabeza de flecha indica su orientación. Las zonas no repetidas (NR1 y NR2) están indicadas por una línea fina. Se muestran las regiones requeridas para la replicación (Rep) y la segregación (SegA y SegB). Las flechas en color fuera del círculo muestran los marcos abiertos de lectura más relevantes y las puntas de flecha que sobresalen indican los subsitos de unión de ω_2 , en las regiones promotoras de los genes *copS*, ω y δ . La línea naranja indica los sitios *six*, la amarilla los *oriS* y la roja los sitios de unión de ω_2 . Las flechas negras en los *oriS* indican la dirección de la replicación.

La replicación de pSM19035 está controlada por tres mecanismos independientes: por un lado, el producto del gen *copS* inhibe el inicio de la transcripción del gen *repS* cuyo producto es esencial para la iniciación de la replicación (en las regiones *oriS*) (Figura 1). Por otro lado, si hay una transcripción activa del promotor del gen *repS* (P_{rep}) se activa la utilización de P_{III} y se sintetiza un ARN anti-sentido, denominado RIII, que impide la transcripción del ARN mensajero de *repS* (Brantl y Wagner, 1997; Brantl, 2007) (Figura 2). Por último, la utilización de promotor de *copS* (P_{cop}) e indirectamente su síntesis, está regulada por el producto del gen ω que está localizado fuera del replicón mínimo.

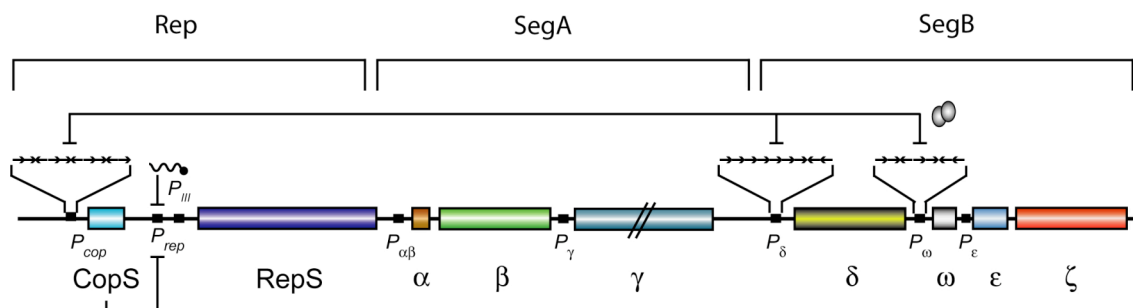


Figura 2. Regiones Rep, SegA y SegB del plásmido pSM19035

Detalle de las regiones involucradas en replicación y segregación estable del plásmido. La proteína ω_2 , en gris, reprime la expresión del operón formado por ω , ϵ y ζ , del gen δ , y del gen *copS* uniéndose a una serie de repeticiones (mostradas como flechas). A su vez, la proteína CopS, reprime la expresión de *repS*, cuyo producto RepS es esencial para el inicio de la replicación del plásmido. Desde el P_{III} , se sintetiza un ARN anti-sentido (ARN III) que impide la transcripción de *repS*.

El plásmido pSM19035 es 1000 veces más estable de lo esperado si el mecanismo de segregación fuera al azar. Se han definido dos regiones discretas, SegA y SegB responsables de la estabilidad segregacional de pSM19035, funcionando ambas actividades independientemente del replicón (Brantl y col., 1990; Ceglowski y col., 1993a; Ceglowski y col., 1993b) (Figura 1). La región SegA codifica las proteínas α , β y γ . Esta región está implicada en la inversión de la mitad de su genoma durante la replicación y la resolución de los multímeros que se forman tras la replicación del plásmido y por ello optimizaría la replicación y maximizaría la segregación al azar. La proteína β es una recombinasa perteneciente a la familia de invertasas-resolvasas que cataliza recombinaciones específicas de sitio. La recombinasa β se une a una región de 85 pares de bases (denominada sitio *six*) dividida en dos sitios adyacentes (sitios I y II) (Alonso y col., 1996; Canosa y col., 1996; Canosa y col., 1998; Canosa y col., 2003; Rojo y Alonso, 1994). Además de incrementar el número de moléculas monoméricas, la proteína β en acción conjunta con la proteína γ (una topoisomerasa III) ejerce control también sobre la replicación del plásmido, mediando el proceso de inversión del ADN necesario para evitar la colisión entre dos horquillas de replicación, ya que el pSM19035 tiene dos orígenes de replicación enfrentados, uno en cada repetición invertida y la replicación es unidireccional (Figura 1). La función de la proteína α es desconocida, y no presenta homología con ninguna proteína de las bases de datos. La organización genética esta conservada en otros miembros del mismo grupo de incompatibilidad como también sus genes, con la excepción del marco de lectura α .

La región SegB contiene 4 marcos abiertos de lectura (δ , ω , ε y ζ) (Figura 1 y 2) que están ordenados en dos unidades transcripcionales, la primera codifica la proteína δ y la segunda unidad es un operón formado por los genes ω , ε y ζ (Figura 2) (Ceglowski y col., 1993a). La función principal de estabilización del plásmido se debe a $\varepsilon\zeta$, un sistema de toxina-antitoxina (TA) (Camacho y col., 2002; Lioy y col., 2006).

Los otros dos productos de la región son δ y ω . La proteína δ (o ParA), que es un dímero en solución (δ_2 , 68 kDa) tiene homología con proteínas del grupo de ATPasas involucradas en partición y la proteína ω (o ParB), que es un dímero en solución (ω_2 , 16 kDa), es el regulador global del plásmido (de la Hoz y col., 2000) (Figura 2). En este trabajo quisimos caracterizar el primer sistema ParAB de firmicutes.

2. Sistemas de estabilidad plasmídica

Hay muchos factores que influyen en la estabilidad segregacional de un plásmido. Uno muy importante es el control del número de copia. Para coexistir establemente con su hospedador, los plásmidos deben controlar su replicación de manera tal que se mantenga un número determinado de copias por célula (del Solar y Espinosa, 2000). En general, para los plásmidos de alto número de copias, se espera que se mantengan establemente en la célula por segregación al azar (binomial). Los plásmidos que se segregan al azar se pierden a una frecuencia de 2^{-n} , donde n es el número de copias por célula antes de la división celular (Nordstrom y Austin, 1989). De acuerdo a esto la frecuencia de pérdida disminuye a medida que aumenta el número de copia del plásmido. Recientemente se ha descrito para algunos plásmidos de alto número de copia la formación de grupos o multímeros (Gordon y col., 2004; Pogliano y col., 2001; Weitao y col., 2000) revelando que aún la segregación al azar es mas complicada de lo que se preveía ya que para todos estos plásmidos estudiados, el número de grupos es siempre menor que el de copias por célula. Estos plásmidos necesitarían la presencia de sistemas de resolución específicos de sitio que resuelven multímeros en monómeros, maximizando así el número de copias previo a la división celular, pero normalmente no los codifican, utilizando sistemas de resolución de la célula.

Por el contrario, los plásmidos de bajo número de copias no pueden confiar en la segregación al azar, por lo tanto dependen de mecanismos que prevengan su pérdida irreversible durante el crecimiento y la división celular. Entre estos sistemas se encuentran la resolución de multímeros, la partición activa de plásmidos o los sistemas de inhibición del

crecimiento post-segregacional de las células que no hayan recibido al menos una copia del plásmido. Nuestro trabajo se centra en los sistemas de partición activa.

2.1. Partición Activa

Los plásmidos de bajo número de copia han desarrollado sitios de partición para estabilizar los replicones asegurando su distribución adecuada antes de la división celular. En todos los sistemas hasta ahora descritos participan dos proteínas que actúan en *trans* con una o más secuencias de ADN, denominados sitios centroméricos, que actúan en *cis* (Figura 3). Los tres componentes son esenciales para el correcto funcionamiento del sistema así como la regulación ajustada de la concentración de las proteínas de partición, ya que un exceso o la falta de una de ellas actúa en detrimento de la correcta segregación de los plásmidos (Lobocka y Yarmolinsky, 1996; Mori y col., 1986). Debido a esto, la transcripción de estos genes está regulada por las mismas proteínas implicadas.

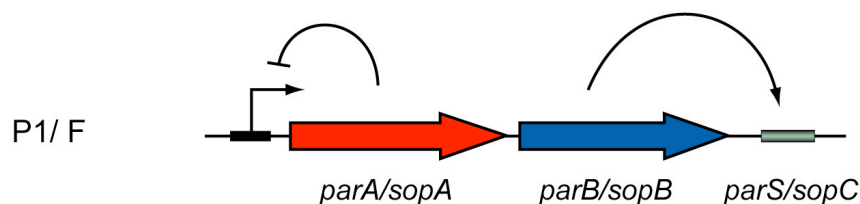
2.1.1. Organización de los módulos de partición

Los sitios de partición suelen estar organizados en un operón (Figura 3). El primer gen codifica una ATPasa. De acuerdo a esta proteína se divide en dos grupos a los distintos sistemas: los de tipo I o ParA y los tipo II o ParM. Las de tipo I pertenecen a una familia de ATPasas caracterizada por la presencia de un dominio de Walker A diferente del consenso y que se encuentra cerca del N terminal de estas proteínas (Koonin, 1993; Motallebi-Veshareh y col., 1990). La superfamilia se denomina ParA/MinD. MinD es una proteína del citoesqueleto de bacterias que cumple un papel fundamental en la determinación del sitio en donde se va a formar el septo en *E. coli* (Shih y Rothfield, 2006). Las proteínas de Tipo I se subdividen en tipo Ia y tipo Ib, las proteínas del primer grupo son mas grandes (370 ± 50 aa) y poseen un motivo hélice-giro-hélice (del inglés *Helix Turn Helix*, HTH) a través del cual unen ADN de manera específica y reprimen su propia transcripción. Las proteínas que pertenecen al segundo grupo unen ADN de manera inespecífica, carecen del dominio HTH y por lo tanto son más pequeñas (Tabla 1). Los sistemas de Tipo II codifican una ATPasa similar a la actina.

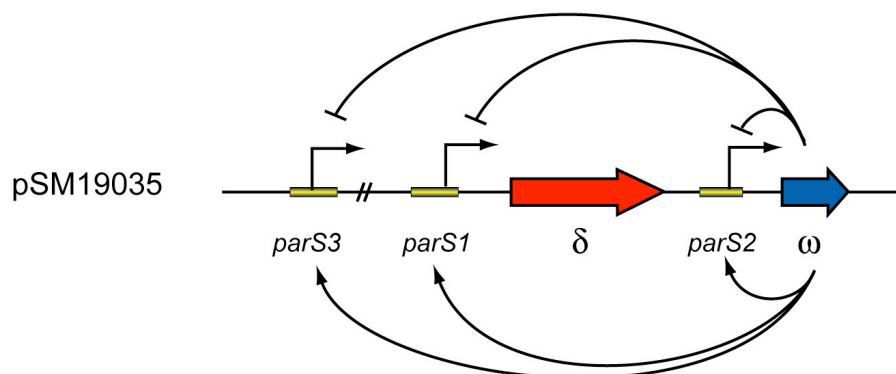
El segundo gen del operón codifica una proteína (*parB* ó *parR*) que une ADN específicamente y reconoce un número variable de repeticiones directas o inversas. La unión de estas proteínas a los sitios consenso da lugar a la formación de un complejo nucleoproteico también llamado “complejo de partición”. Entre estas proteínas hay más heterogeneidad que entre las ATPasas. Las proteínas tipo ParR o ParB reconocen al ADN a través de dominios

HTH o hoja-hélice-hélice (RHH, del inglés *Ribbon Helix Helix*, ver más adelante). El *locus* de partición esta normalmente organizado en un operón, aunque en el plásmido pSM19035 está en dos unidades diferentes.

Tipo Ia



Tipo Ib



Tipo II

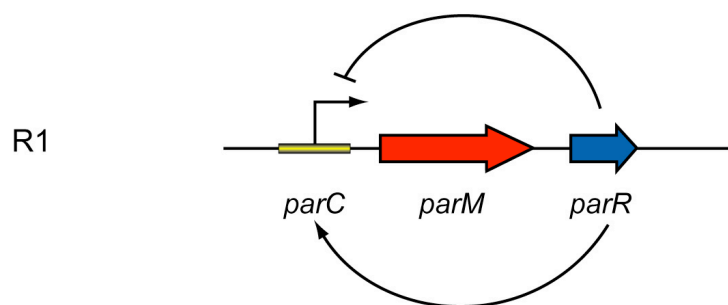


Figura 3. Organización genética de los sitios de partición activa

Organización de sitios de sistemas del Tipo Ia, Ib y Tipo II. Las flechas rojas representan los genes que codifican la ATPasa (ParA), las azules, los genes que codifican la proteína (ParB) que se une a la secuencia tipo centrómero (*parS*) que están indicadas en amarillo o en verde. Los promotores se muestran como una caja negra y si solapan con el sitio *parS/parC* se muestran de color amarillo. La caja de color verde indica que se trata sólo de un sitio centromérico. Las flechas indican unión al ADN, mientras que los arcos indican represión transcripcional.

Tabla 1. Comparación entre los diversos sitios de partición

Familias	Funciones en <i>trans</i>			En <i>cis</i>
Tipo I o ParA (Tipo Walker)		ParA (ATPasa débil)	ParB (unión a ADN)	Sitio centromérico
	Ia	(370 ± 50 aa) P1-ParA ^a F-SopA RP4-IncC	(330 ± 20 aa) P1-ParB F-SopB RP4-KorB	(aguas abajo) <i>parS</i> (+ IHF) <i>sopC</i> (iterones) complejo
	Ib	(260 ± 60 aa) ParA (Bsu-Soj) pB171-parA TP228-ParF pSM19035-δ	(220 ± 80 aa) ParB (Bsu-Spo0J) pB171-parB Ib' ParB (70 ± 25 aa) TP228-ParG pSM19035-ω	(aguas arriba) <i>parS</i> <i>parC1</i> y <i>parC2</i> <i>desconocido</i> <i>parS1</i> , <i>parS2</i> y <i>parS3</i>
Tipo II o ParM (tipo actina)	R1-ParM		R1-ParR	<i>parC</i> (iterones)

^a Se indica el nombre de la proteína con un prefijo que indica su origen. P1: plásmido P1, etc.

2.1.2. Sistemas de partición activa plasmídicos

Entre los sistemas más estudiados se encuentran los plásmidos de bajo número de copia P1, F y R1 de *E. coli*. Los dos primeros codifican un *locus* tipo I y es interesante destacar que es el sistema más ampliamente extendido lo que parece indicar que evolutivamente el sistema tipo I es más óptimo. El plásmido R1 codifica un *locus* tipo II.

2.1.2.1. Sistemas tipo Ia: plásmidos P1 y F

La proteína ParA del plásmido P1, es una ATPasa muy débil que es estimulada *in vitro* por la proteína ParB y por ADN inespecífico (Davis y col., 1992). Esta actividad es crucial para la segregación plasmídica ya que el nucleótido al que está unido ParA determina su función. Así, ParA•ATP interacciona con el complejo de partición (la proteína ParB unida al sitio centromérico) mientras que ParA•ADP es la forma en que la proteína se une al promotor del operón y reprime la transcripción del mismo (Bouet y Funnell, 1999). La proteína es un dímero tanto en presencia de ATP como de ADP (Davey y Funnell, 1994).

El sitio *parS* (o sitio centromérico) (Figura 4) de 80 pb está distribuido a ambos lados del sitio de unión de la proteína IHF (del inglés *Integration Host Factor*). Está formado por dos tipos de secuencias repetidas: una de siete pares de bases, denominada caja A, que esta a

ambos lados del sitio de unión de IHF y a su derecha forma una repetición invertida imperfecta. La otra secuencia consiste en 6 pares de bases, se denomina caja B y hay una a cada lado del sitio de unión de IHF. Este factor cumple una función arquitectural, dobla el ADN y acerca los sitios *parS* (Funnell, 1991).

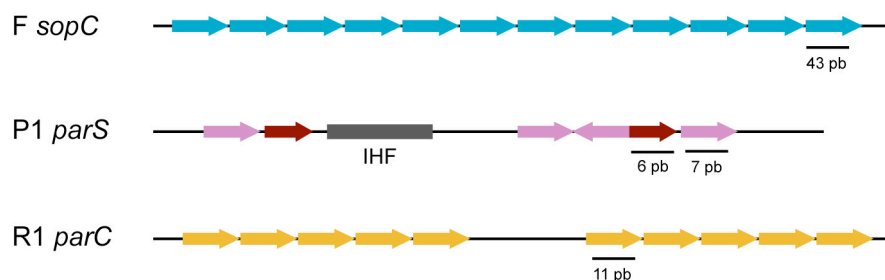


Figura 4. Organización de los sitios de partición de los plásmidos F, P1 y R1

Las secuencias mostradas son el sitio consenso de unión de las proteínas ParB de estos sistemas. Las flechas indican cada una, una serie de repeticiones. Se indica en cada una, el número de pares de bases que compone cada repetición

Recientemente se ha descrito que en la región C-terminal de la proteína ParB se encuentra la información necesaria para unir los sitios *parS* y para formar los dímeros de ParB (ParB_2). Los contactos entre ParB_2 y los sitios *parS* son de dos maneras diferentes a) a través del dominio HTH que contacta las cajas A y b) a través de un nuevo dominio de interacción con ADN que solapa con el dominio de dimerización, el cual contacta las cajas B y puede acercar los dos brazos de ADN alrededor del sitio IHF. Una sola molécula de ParB puede unirse a una molécula de ADN a través del motivo HTH y a una segunda molécula de ADN por medio del dominio de dimerización, facilitando la formación de formas complejas de moléculas apareadas a través del sitio centromérico (Schumacher y Funnell, 2005). ParB es capaz de polimerizar sobre el ADN desde el sitio *parS* y se extiende hasta al menos 11 kb, impidiendo la transcripción de los genes vecinos (Rodionov y col., 1999). Recientemente se mostró que para el proceso de partición no es esencial ésta polimerización (Rodionov y Yarmolinsky, 2004).

La correcta segregación del plásmido P1 requiere además la presencia de ParA en el complejo de partición aunque ésta no se una directamente al sitio *parS*. Se postula que ParA

sería reclutado al complejo mediante interacción proteína-proteína con la región N-terminal de ParB (Bouet y Funnell, 1999; Fung y col., 2001; Funnell, 2005).

Como se ha mencionado antes, la regulación de estos genes es esencial ya que la sobreexpresión de cualquiera de las dos proteínas interfiere con la partición (Lobocka y Yarmolinsky, 1996).

De manera similar, el *locus par* del plásmido F esta formado por el sitio centromérico *sopC*, y las proteínas SopA y SopB. El sitio *sopC* consiste en 12 repeticiones directas de 43 pares de bases cada una (Figura 4). Una sola de estas repeticiones es suficiente para mantener establemente un plásmido mini-F (Biek y Shi, 1994). Al igual que ParB de P1, SopB se une a la región *sopC* por medio de un dominio HTH y esta unión afecta la superhelicidad del plásmido y silencia los genes flanqueantes (Lemonnier y col., 2000; Lynch y Wang, 1995). No se ha demostrado que SopB pueda formar un filamento nucleoproteico y por lo tanto se postula que el silenciamiento es debido a que SopB mantiene a la región *sopC* en una posición específica de la célula, cerca de los polos, haciéndola inaccesible a la ARN Polimerasa (Lynch y Wang, 1995).

Como ParA, SopA tiene dos roles: uno en estabilidad segregacional y otro como represor transcripcional. SopA regula la expresión del operón y esta represión es estimulada por SopB y, a diferencia de ParA, es independiente de nucleótido (Mori y col., 1989; Watanabe y col., 1989). La débil actividad ATPasa de SopA es estimulada por SopB pero sólo en presencia de ADN (Watanabe y col., 1992). Recientemente se ha reportado que SopA forma polimeros *in vitro*, cuya formación es estimulada por SopB, pero inhibida por el ADN (Bouet y col., 2007). También en este sistema resulta importante la autorregulación ya que un exceso de las proteínas causa inestabilidad (Mori y col., 1989; Ogura y col., 1990).

Se posee mucha información bioquímica de estas proteínas y se han realizado estudios *in vivo* pero aún no se ha podido describir un modelo en el que todos los datos encajen.

No se ha llevado a cabo en firmicutes ningún estudio con sistemas de este tipo.

2.1.2.2. Sistemas tipo Ib: Plásmidos pB171 y TP228

Los sistema tipo Ib (Tabla 1) están mucho menos estudiados. En el plásmido pB171 la proteína ParA, forma filamentos *in vitro* independientemente de la presencia de ParB y del ADN. *In vivo*, se ha observado que oscila en el nucleoide de células de *E. coli*, formando estructuras filamentosas, para lo cual requiere el motivo de unión a ATP intacto y la oscilación es modulada por la proteína ParB y el sitio centromérico. En ausencia de ParB, las estructuras permanecen pero son estáticas (Ebersbach y Gerdes, 2001, 2004).

En el plásmido TP228, la proteína ParF forma filamentos *in vitro*. La proteína ParG, cuya estructura fue resuelta y presenta un dominio RHH (Golovanov y col., 2003) actúa en conjunto con la proteína ParF. La polimerización de ParF está modulada por ParG, proteína que se une a los sitios centroméricos, aún sin determinar. ParG estimula la actividad ATPasa de ParF y, cuando está en baja concentración respecto a la de ParF, estimula la formación de los filamentos de ParF. En cambio, a altas concentraciones relativas a ParF, antagoniza la polimerización de éstos (Barilla y col., 2005).

En este trabajo se caracterizará el primer sistema plasmídico tipo Ib en firmicutes.

2.1.2.3. Sistema tipo II: Plásmido R1 y los filamentos tipo actina

Dentro de los sistemas de partición de tipo II, el más investigado es el formado por ParM/ParR/*parC* del plásmido R1 (Tabla 1). La organización genética de este *locus* se muestra en la Figura 3 y en la Figura 4, el sitio centromérico, *parC*. Éste se encuentra aguas arriba de *parM* y *parR*, y comprende el promotor del operón flanqueado por dos grupos de 5 repeticiones de 11 pares de bases cada una. La transcripción de estos genes está regulada por ParR, mientras que ParM (la ATPasa de este sistema) no está involucrada en la regulación (Jensen y col., 1994). ParR, como dímero, se une cooperativamente a las 10 repeticiones formando un complejo que media apareamiento de los plásmidos (Breuner y col., 1996; Jensen y col., 1998).

ParM, pertenece a la superfamilia de ATPasas que incluye, entre otras, a la actina de eucariotas y a las proteínas bacterianas involucradas en división celular MreB y FtsA. ParM hidroliza ATP y esta actividad, que se ve estimulada por ParR unida a *parC*, es necesaria para la correcta segregación de los plásmidos (Jensen y Gerdes, 1997). De la estructura de ParM se puede deducir que forma protofilamentos en forma de doble hélice (van den Ent y col., 2002). Estudios citológicos demostraron que, *in vivo*, ParM forma filamentos dinámicos que dependen de la presencia de ParR/*parC* (Moller-Jensen y col., 2002). Recientemente, estudios *in vitro* demostraron además que ParM exhibe “inestabilidad dinámica”, un cambio entre fases de elongación y acortamiento del filamento, que fue descrito para tubulina y actina (Garner y col., 2004). Los filamentos de ParM crecen bidireccionalmente y luego decaen. Esta inestabilidad está ligada a la actividad ATPasa de ParM. La observación de que la concentración mínima para obtener un filamento de ParM (2,3 μM) es menor a la estimada en la célula (de 12 a 14 μM) lleva a concluir que no se necesita un factor de nucleación y se propone el siguiente modelo para la partición mediada por ParM/ParR/*parC*. ParM formaría filamentos espontáneamente en la célula, la hidrólisis de ATP llevaría a la desintegración del

filamento salvo que uno de ellos encuentre un grupo de plásmidos apareados. La interacción con el complejo ParR/*parC*, estabiliza el filamento en ambos extremos y por inserción de monómeros de ParM, el filamento se extiende y empuja los plásmidos a direcciones opuestas en la célula, asegurando su correcta segregación (Garner y col., 2004; Garner y col., 2007; Moller-Jensen y col., 2003).

2.1.3. Sistemas de partición activa en cromosomas bacterianos

Una punto interesante era saber si en los cromosomas se encontraban sistemas con funciones similares a los codificados por los plásmidos. Se encuentran homólogos cromosomales tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas, con la notable excepción de γ -proteobacterias, incluyendo *E. coli* (Gerdes y col., 2000; Yamaichi y Niki, 2000).

La mayoría de los cromosomas bacterianos codifican *loci* Tipo I. Hasta el momento no se ha encontrado ninguno con un *locus* Tipo II. La presencia de estos sistemas inmediatamente sugería un rol en segregación cromosomal, pero la falta de un fenotipo claro en segregación en mutantes de delección, ha dificultado probar esta hipótesis.

Como en los sistemas codificados en plásmidos, estos *loci* codifican dos proteínas y un número de sitios en *cis*, dispersos por el cromosoma. El sistema cromosomal más estudiado es el presente en *B. subtilis* que codifica las proteínas Soj y Spo0J y fue inicialmente estudiado porque los mutantes *spo0J* son defectivos en esporulación y *soj* suprime ese defecto (Ireton y col., 1994).

La proteína Soj es miembro de la superfamilia MinD/ParA. Spo0J reconoce 8 sitios centroméricos ubicados en el 20% mas próximo a ambos lados del origen de replicación (*oriC*) en el cromosoma de *B. subtilis* (Lin y Grossman, 1998). Una delección en Spo0J resulta en células elongadas con nucleoides morfológicamente anormales además de un 3% de células anucleadas (Autret y col., 2001; Ireton y col., 1994). La comparación de la posición de los orígenes de replicación muestra que enseguida después de la replicación, están más cerca uno del otro en células *spo0J* que en células silvestres (Lee y col., 2003), sugiriendo un rol en la segregación y/o organización del origen de replicación. Una delección en Soj, en cambio, no muestra ningún efecto en la segregación del nucleoide (Ireton y col., 1994). Sin embargo existe la posibilidad de que Soj este involucrada en la compactación del cromosoma, ya que la pérdida de Soj en células que no tienen la proteína Smc (del inglés *Structural Maintenance of Chromosomes*, involucradas en el mantenimiento del cromosoma) incrementa significativamente el número de células anucleadas (Lee y Grossman, 2006). Soj, como

represor transcripcional, regula la transcripción de varios genes, un efecto que es antagonizado por Spo0J (Ireton y col., 1994; Quisel y col., 1999; Quisel y Grossman, 2000).

A diferencia de lo observado para la segregación cromosomal, tanto Soj como Spo0J son requeridas para estabilizar un plásmido con una sola secuencia *parS* del cromosoma, en *B. subtilis* y en *E. coli* (Lin y Grossman, 1998; Yamaichi y Niki, 2000).

Estudios de localización celular muestran que Soj-GFP, en presencia de Spo0J, se mueve de un nucleoide a otro en *B. subtilis*. Esta oscilación es dependiente de la actividad ATPasa de Soj. Cuando Spo0J esta ausente, Soj se reubica y se encuentra unida estáticamente al nucleoide, donde reprime a los promotores específicos de esporulación, explicando así el defecto en esporulación de los mutantes *spo0J* (Marston y Errington, 1999; Quisel y col., 1999; Quisel y Grossman, 2000).

La estructura de Soj de *T. thermophilus* ha sido recientemente resuelta. Como se había predicho Soj tiene homología estructural con MinD (Leonard y col., 2005). Soj y MinD son dímeros solo en presencia de ATP (Cordell y Lowe, 2001; Hayashi y col., 2001; Leonard y col., 2005). Soj exhibe, *in vitro*, capacidad de polimerizar sobre el ADN, de manera dependiente de ATP e independientemente de Spo0J. Al igual que con los componentes de sistemas de partición plasmídicos, Spo0J estimula la (en sí débil) actividad ATPasa de Soj (Leonard y col., 2005).

2.1.4. El sistema de partición activa del plásmido pSM19035

En trabajos previos, se encontró que la proteína δ_2 del plásmido pSM19035 posee dominios conservados con el grupo de ATPasas con un dominio de Walker atípico que están involucradas en segregación de ADN (Ceglowski y col., 1993a; Motallebi-Veshareh y col., 1990). A pesar de que δ_2 no está en un operón, su expresión esta regulada por la proteína ω_2 (Figura 2 y 3), y su organización genética recuerda a la de los sistemas de partición tipo Ib.

Mientras se llevaba a cabo este trabajo, se reportó que las proteínas δ_2 y ω_2 , *in vivo*, eran capaces de estabilizar un replicón, utilizando cualquiera de los sitios de unión de ω_2 al ADN (P_{cop} , P_δ y P_ω) como sitio centromérico (*parS3*, *parS1* y *parS2*) (Dmowski y col., 2006) (Figura 5A).

Se sabe muy poco sobre el sistema de partición activa en los plásmidos del grupo *inc18* y mucho menos de los plásmidos de firmicutes. Los plásmidos del grupo *inc18* codifican dos productos (δ y ω) que están altamente conservados entre ellos. Se conoce muy poco sobre la genética y función bioquímica de la proteína δ , pero se sabe que la proteína ω regula de

manera directa la estabilidad plasmídica y de manera indirecta las fluctuaciones en el número de copias de estos plásmidos (de la Hoz y col., 2000).

3. La proteína ω_2 es el regulador del plásmido pSM19035

3.1. Características y función de la proteína ω_2

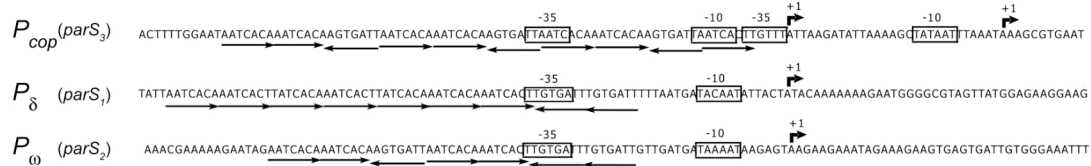
La regulación génica en procariotas es realizada mayoritariamente por proteínas con motivos de HTH de unión al ADN. Estas proteínas interactúan con secuencias de ADN palindrómicas y mediante esta interacción específica, reprimen o activan la expresión de genes o grupos de genes (Ptashne, 1986). El reconocimiento de grupos de repeticiones directas en la secuencia de ADN no es usual en bacterias (Blanco y col., 2002; de la Hoz y col., 2000; Kalivoda y col., 2003; Moller-Jensen y col., 2003).

Las proteínas con dominio RHH, o $(\beta\alpha\alpha)_2$ son una creciente familia de proteínas que se unen al ADN y cada monómero presenta una hoja β y dos hélices α separadas por un bucle. Muchas de ellas han sido estudiadas por cristalografía de rayos X y estudios espectroscópicos (RMN) (Golovanov y col., 2003; Gomis-Ruth y col., 1998; Murayama y col., 2001; Raumann y col., 1994; Schildbach y col., 1999; Schreiter y col., 2003; Somers y Phillips, 1992). Entre las características del dominio de unión a ADN de estas proteínas se encuentran 2 hojas β antiparalelas que contactan específicamente y de manera dependiente de secuencia, con el surco mayor del ADN, y también varios residuos de la segunda α -hélice (α_2) interactúan con el esqueleto de fosfatos del ADN. La mayoría de las proteínas RHH, que son dímeros simétricos, se unen como tetrámeros u oligómeros de mayor número de unidades, a las secuencias de los operadores. Éstos contienen dos o más sitios de unión que son generalmente repeticiones invertidas (Arc, CopG) o directas (MetJ, ω_2) para cada dominio de unión a ADN (Gomis-Ruth y col., 1998 ; Raumann y col., 1994; Somers y Phillips, 1992). MetJ interactúa simétricamente con su sitio consenso de unión, mientras que Arc o CopG interactúan asimétricamente con su sitio palindrómico (Gomis-Ruth y col., 1998 ; Raumann y col., 1994; Somers y Phillips, 1992).

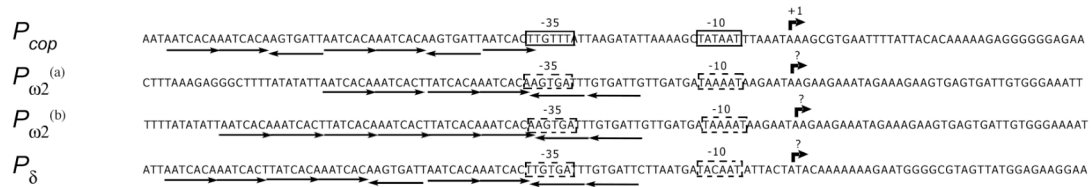
La proteína ω , de 7.956 Da, es un dímero en solución (ω_2) y pertenece a la familia de proteínas RHH (Murayama y col., 2001), se une a secuencias repetidas que se encuentran en las regiones promotoras de genes involucrados en el control del número de copia del plásmido

($P_{cop}/parS3$), partición ($P_{\delta}/parS1$) y partición y sistema de muerte post-segregacional ($P_{\omega}/parS2$) (Camacho y col., 2002; de la Hoz y col., 2000; Meinhart y col., 2003) (Figura 5A). Al unirse a estas secuencias promotoras reprime la transcripción de estos genes, por un mecanismo que aun no se ha establecido, pero que no es mero impedimento estérico (de la Hoz y col., 2000).

A pSM19035



B pIP501, pAMβ1 y pRE25



C

pSM19035	(1)	MIVGNLGAQKAKRNDTPISAKKDIMGDKTVRVRADLHHIIKIETAKNGGNVKEVMDQALEEYIRKYLDPDKL	71
pIP501	(1)	VIVGNLGAQKAKRNDTPISAKKDIMGDKTVRVRADLHHIIKIETAKNGGNVKEVMDQALEEYIRKYLDPDKL	71
pAMβ1	(1)	VIVGNLGAQKAKRNDTPISAKKDIMGDKTVRVRADLHHIIKIETAKNGGNVKEVMDQALEEYIRKYLDPDKL	71
pIP501	(2)	VIVGNLGAQKAKRNDTPISAKKDIMGDKTVRVRADLHHIIKIETAKNGGNVKEVMEIRLSKLSKSVLIVQYLKILYNRN	79
pAMβ1	(2)	VIVGNLGAQKEKRNTPISAKKDIMGDKTVRVRADLHHIIKIETAKNGGNVKEVMEIRLSKLSKSVLIVQYLKILYNRN	79
pIP402	(2)	VIVGNLGAQKAKRNDTPISAKKDIMGDKTVRVRADLHHIIKIETAKNGGNVKEVMEIRLSKLSKSVLIVQYLKILYNRN	79
pSMB47	(2)	VIVGNLGAQKEKRNTPISAKKDIMGDKTVRVRADLHHIIKIETAKNGGNVKEVMEIRLSKLSKSVLIVQYLKILYNRN	79

Figura 5. Comparación de las secuencias de los sitios de unión de ω_2 y de las secuencias de las proteínas ω y ω_2 .

(A) Secuencias promotoras de los genes regulados por ω_2 en el plásmido pSM19035. Las cajas indican las regiones -35 y -10 de P_{cop} , P_{δ} y P_{ω} . +1 indica el sitio donde se inicia la transcripción. Las repeticiones de 7 pb y sus orientaciones relativas se muestran con flechas debajo de las secuencias. La denominación de $parS1$, $parS2$ y $parS3$ hace referencia a la utilización de estos sitios de unión de ω_2 como sitios centroméricos del sistema de partición activa del plásmido pSM19035. (B) Secuencias promotoras de los genes conservados en los plásmidos pIP501 y pAMβ1 del grupo *inc18*, y en el plásmido pRE25, que contiene parte del plásmido pIP501 y pSM19035. (a) Región promotora de proteína ω_2 hallada en pAMβ1 (b) Región promotora de proteína ω_2 presente en el plásmido pIP501. Las cajas con línea discontinua indican las posibles regiones -35 y -10 (C) Comparación de secuencias de la proteínas ω_2 presente en pSM19035 y de la proteína ω_2 presente en otros plásmidos que llevan además una proteína ω_2 , que presenta un C-terminal diferente al de ω_2 . Los números entre paréntesis indican cuál versión de la proteína ω_2 se indica, y los números al final de la secuencia, el número de aminoácidos. El plásmido pIP402 y el pSMB47 también fueron aislados de bacterias Gram-positivas.

El sitio consenso de unión de ω_2 consiste en dos (P_ω) o tres (P_{copS}) copias de un bloque compuesto por dos repeticiones directas y una inversa de 7 pares de bases (5'-^A/TATCAC^A/T-3') representado por $\rightarrow\rightarrow\leftarrow$, más una repetición directa adicional (\rightarrow) aguas abajo del último bloque en P_{cop} , o una inversa (\leftarrow) aguas abajo del último bloque en P_ω (Figura 5A). En el P_δ hay siete repeticiones directas y dos invertidas. Este tipo de organización de sitios de unión está bien documentada para factores de transcripción en eucariotas que se unen cooperativamente a unidades repetidas en tandem [por ej. TFIIA (Rhodes y Klug, 1986), la familia de proteínas STAT (Xu y col., 1996), HSF protein (Xiao y col., 1991), la familia de proteínas IRF (Uegaki y col., 1993), proteínas MR-GR (Ou y col., 2001), la superfamilia de proteínas NR (TRE, VDR, RAR, RXR) (Naar y col., 1991; Rastinejad y col., 1995; Umesono y col., 1991)]. En estos casos la orientación relativa y el espaciado entre los motivos centrales que son reconocidos por las proteínas, tienen un rol esencial en la especificidad de la unión al ADN y la activación transcripcional.

La proteína ω_2 se encuentra conservada en los plásmidos del grupo de incompatibilidad *inc18* (pIP501 y pAM β 1), así como las repeticiones a las que se une (Figura 5B y 5C). El plásmido pRE25 (Schwarz y col., 2001) fue aislado de *E. faecalis* y tiene parte de la secuencia del pIP501 y del plásmido pSM19035. El gen *copS* de pSM19035 se encuentra conservado en pIP501 y pAM β 1 (*copR* y *copF*, respectivamente), pero la región promotora tiene 3 repeticiones menos. El gen δ es idéntico en los plásmidos del grupo *inc18*, y en la región promotora se encuentra una repetición en la orientación contraria (Figura 5B).

Todos los plásmidos del grupo poseen una copia de ω_2 (Figura 5C) y, salvo en el plásmido pSM19035, hay un segundo marco de lectura (ω_2) que codificaría una proteína más larga, de 79 aminoácidos, que difiere de ω_2 a partir del aminoácido 55. Las hojas β antiparalelas, que es la región por donde las proteínas de esta familia se unen al ADN, son idénticas en ambas variantes, por lo que se presume que pueda unirse al ADN de manera similar a ω_2 . Esta proteína fue clonada y se sobre-expresó para intentar purificarla, pero el producto que se obtuvo era insoluble (la proteína ω_2 es altamente soluble) y por ello se decidió dejar su estudio para más adelante. Las regiones promotoras del gen ω_2 se muestran en la Figura 5B. No hay evidencias de que esta variante de ω_2 se este expresando *in vivo*.

3.2. Estructura de ω_2 en solución

Se obtuvo la estructura de ω_2 en solución (Murayama y col., 2001) (Figura 6A). Durante la cristalización de la proteína ω_2 , los residuos de la región N-terminal Met1-Ala20 se perdieron por proteólisis. Los residuos Lys21-Asp23 de la subunidad I y Lys21'-Lys22' no se pudieron identificar en el mapa de densidad electrónica por encontrarse desordenados. Se llevó a cabo una predicción de estructura secundaria para la proteína ω_2 en la cual la región N-terminal entera se encontraría desordenada (Figura 6B). En otros miembros de la familia RHH, esta región es flexible (Golovanov y col., 2003).

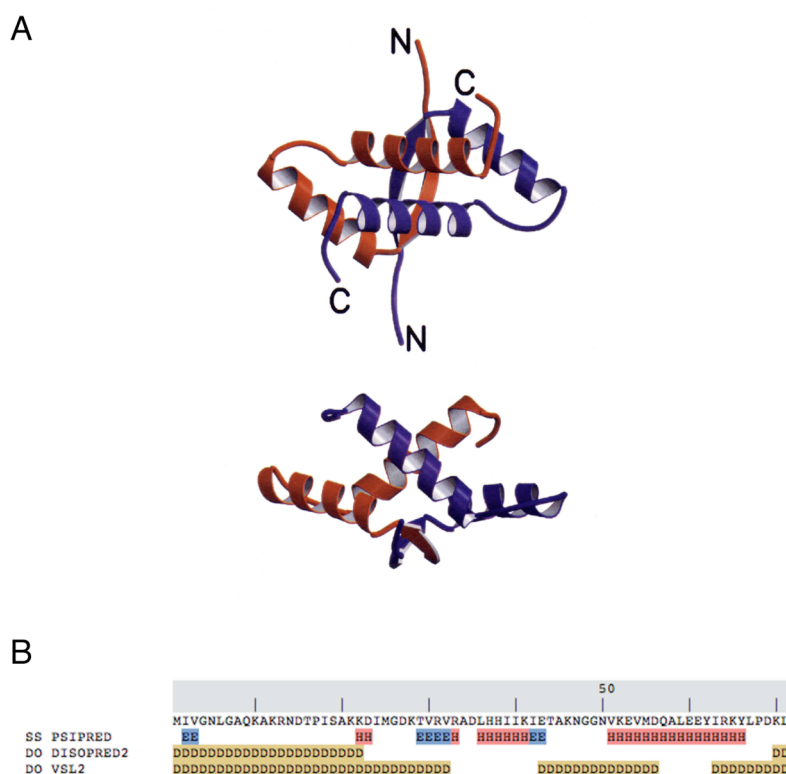


Figura 6. Estructura de ω_2

(A) Diagrama del homodímero de ω . Las subunidades I y II aparecen en rojo y azul, respectivamente. Arriba, vista desde arriba de ω_2 . El eje de simetría es perpendicular al plano del papel, abajo, el eje de simetría está en el papel. (B) Predicción de estructura secundaria de ω_2 . Se marca con D la zona que podría estar desordenada, E significa alta probabilidad de encontrar hojas β , H, estructuras de hélice α . A la izquierda se indican los diferentes programas utilizados para las predicciones.

Las hojas β antiparalelas de la proteína ω_2 están formadas por los residuos Lys28-Val32 y Lys28'-Val32' (Murayama y col., 2001). En el modelo de ω_2 unido a ADN, la hoja β antiparalela contiene los residuos Arg31 y Arg31' (que se corresponden con el residuo Arg13 en Arc), estos residuos están orientados hacia el surco mayor del ADN y es capaz de hacer contactos con las guaninas (Murayama y col., 2001). La sustitución del residuo Arg13 de Arc por una Ala, reduce la unión del represor al ADN, pero también lo hace el cambiar otros residuos de la hoja β (Glu9 y Asn11) (Brown y col., 1994). Sin embargo, en MetJ y CopG, el residuo Thr en la hoja β , tiene un rol importante en el reconocimiento de la secuencia consenso de cada uno (Gomis-Ruth y col., 1998) (Somers y Phillips, 1992).

∴ OBJETIVOS ∴

El objetivo que se planteó al inicio de esta tesis doctoral, fue el estudio del sistema de partición activa del plásmido pSM19035 y el análisis detallado de sus componentes, las proteínas δ_2 y ω_2 . Para comprender mejor los mecanismos de segregación del ADN plasmídico se propusieron los siguientes objetivos:

1. Definir el modo de unión de ω_2 al ADN y las razones por las que no necesita discriminar entre secuencias palindrómicas y no palindrómicas.
2. Caracterización de los dominios de unión al ADN, de dimerización y tetramerización de ω_2 y analizar el posible papel de la región N-terminal posiblemente desordenada de la proteína ω_2 .
3. Caracterización genética y citológica de la proteína δ_2 y su interrelación con ω_2 y el ADN con secuencias *parS*.
4. Caracterización bioquímica de la proteína δ_2 en presencia y/o ausencia de ω_2 y ADN *parS*.
5. Caracterización del sistema de partición activa del plásmido pSM19035.

∴ MATERIALES Y MÉTODOS ∴

1. Materiales

1.1. Cepas

Las cepas utilizadas y construidas en este trabajo se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 2. Cepas

CEPA	GENOTIPO	UTILIZACIÓN
<i>E. coli</i> XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^q ZΔM15 Tn10</i> (Tet)] (Stratagene)	Células para construcción y mantenimiento de plásmidos.
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pLysS B F- <i>dcm ompT hsdS</i> (rB- mB-) <i>gal</i> (DE3) [pLysS Cat] (Stratagene)	Sobreproducción de las proteínas: ω_2 , $\omega_2\Delta 8$, $\omega_2\Delta 18$, $\omega_2\Delta 19$, $\omega_2\Delta 25$, δ_2 , δ_2 -His ₆ , δ_2 K36A-His ₆
<i>B. subtilis</i> YB886	<i>amyE</i> , <i>attSPB</i> , <i>metB5</i> , <i>sigB37</i> , <i>trpC2</i> , <i>xin-1</i>	Cepa silvestre
<i>B. subtilis</i> BG508	<i>amyE</i> : P_{δ} : <i>lacZ</i> , <i>attSPB</i> , <i>metB5</i> , <i>sigB37</i> , <i>trpC2</i> , <i>xin-1</i>	Ensayos <i>in vivo</i> , para estudiar la actividad de la proteína ω_2 sobre la utilización del promotor de δ_2 (P_{δ})
<i>B. subtilis</i> BG947	<i>amyE</i> : $P_{Hyperspank}$: δ -GFP, <i>attSPB</i> , <i>metB5</i> , <i>sigB37</i> , <i>trpC2</i> , <i>xin-1</i>	Ensayos <i>in vivo</i> , para estudiar la localización celular de la proteína de fusión inducible por IPTG
<i>B. subtilis</i> BG949	<i>amyE</i> : $P_{Hyperspank}$: δ K36A-GFP, <i>attSPB</i> , <i>metB5</i> , <i>sigB37</i> , <i>trpC2</i> , <i>xin-1</i>	Ensayos <i>in vivo</i> , para estudiar la localización celular de la proteína de fusión inducible por IPTG

1.2. Reactivos y materiales

En la tabla 3 se muestran los reactivos y material utilizados:

Tabla 3. Productos

PRODUCTO	CASA COMERCIAL
[α ³² P]- dATP, [γ ³² P]- ATP	Amersham Bioscience
Sepharosa G-50, G-25, Q-Sepharosa, SP-Sepharosa	Amersham Pharmacia Biotech
Columna de cromatografía Micro Bio-Spin	Bio Rad
DNasa I	Boheringer Mannheim
IPTG, rifampicina	Calbiochem
SDS, Sulfato amónico	ICN
Ascorbato Sódico.	Aldrich

Metanol, Hidrolizado de caseína	Fluka
Enzimas de restricción, fragmento klenow de ADN polimerasa I	MBI Fermentas
Acetato sódico trihidrato, Ac. bórico, Ac. Clorhídrico, Ac. Fórmico, Ac. Tricloracético, Alcohol Isoamílico, Azul de Coomassie, Cloroformo, Cloruro magnésico hexahidratado, Etanol Absoluto, Imidazol, Isopropanol, Glicina, Hidróxido de Sodio, Hierro (II) amonio-sulfato hexahidratado, Dimetilsulfóxido, Isopropanol, L-metionina, Parafina, Titriplex (EDTA), Tritón-X 100, Urea, 2 nirofenil-β-galactopiranosido, folios de cromatografía en capa fina de celulosa-PEI	Merck
Filtros de 0.05 μm (tipo VM), 0.45 μm (tipo HAWP), 0.22 μm (tipo Millex-GS)	Millipore
Glicerol	MP Biomedicals
Enzimas de restricción, polinucleótido kinasa (PNK), T4 ligasa	New England Biolabs
Acido Acético Glacial, Vaselina filante	Panreac
Agarosa, Agar bacteriológico, extracto de levadura	Pronadisa
Ni-NTA agarosa	Qiagen
FastStart Taq DNA polymerase, RNasa A pancreática, DAPI	Roche
Acrilamida, bisacrilamida	Serva
Ampicilina, Bromuro de Etidio, Cloranfenicol, Glutaraldehído, Lisozima, Xylene cianol, Thiourea, DSS,	Sigma
Vectashield (medio de montaje para fluorescencia)	Vector Laboratories
Fosfatasa alcalina (SAP), LB, Tris Ultrapuro	UBS
Fosfocelulosa.	Whatman

En la siguiente tabla se muestran los oligonucleótidos utilizados para generar los mutantes puntuales y los mutantes de delección de las proteínas ω_2 y δ_2

Tabla 4. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia
WD18	5'- GGC GCA CAA AAA GCT TAA CGG GAG GAT ACA CCA ATG AGT GCA AAA AAA G - 3'
WD25	5'- GAT ACA CCA AGC TTT GCG GAG GAA GAT ATA ATG GGA GAT AAG AC -3'
WD8	5'- GGC GAA GCT TGT GAT TGT GGA GGA TTT AGG CAT GCA AAA AGC AAA ACG -3'

Nombre	Secuencia
K36A	5' - GGT GTT GGA GCG TCA AAA TTA TC -3'
K36A'	5' - GAT AAT TTT GAC GCT CCA ACA CC -3'
H38V	5' - CGA TTT TTA TGA TAA CGT GCA AG -3'
H38V'	5' - CTT GCA CGT TAT CAT AAA AAT CG -3'
DHISU	5' - GTG ATT TTC ATA TGA TAC AAT ATT AC -3'
DHISD	5' - GGA ACC CTC GAG TTC TTT TTC -3'
deltaXHO1-2	5' - ATA AGC TCG AGT TCT TTT TCG TTT TCT AAT TGA A-3
deltaECO	5' - AAA GAA TTC CTG GAG GGA AAA G -3'
GFP-ATG	5' - GAA TTG GGA CAA CTC CAG -3

2. Métodos

2.1. Manipulación de células

2.1.2. Obtención de células competentes.

Las células competentes en *E. coli* se obtuvieron creciéndolas en LB a 37°C. Las células se recogen las células en fase logarímic (DO₅₆₀=0,4), se tratan sucesivamente con MgCl₂ 0,1M y CaCl₂ 0,1M, el CaCl₂ hace permeable las paredes de las células, de modo que el ADN presente en el medio, puede entrar en dichas células. Las bacterias competentes se pueden conservar a -80°C con glicerol al 15%. Todo el proceso debe desarrollarse a 4°C. La eficiencia obtenida suele ser de 10⁶ células transformadas/μg de ADN plasmídico (Hanahan, 1983).

B. subtilis tiene competencia natural bajo determinadas condiciones de desarrollo y nutricionales. Para obtener células competentes lo que se hace es inocular una colonia en el medio GM1, se deja crecer durante toda la noche a 30°C, sin agitación, a la mañana siguiente se hace un dilución de forma que el cultivo quede a DO₅₆₀=0,04, se pone a crecer a 37°C en agitación y una vez hayan pasado 90min. desde que el cultivo entró en fase estacionaria, se añade el 15% de glicerol y se congelan rápidamente a -80°C (Bott y Wilson, 1968).

Medio GM1: Sbase 1X, glucosa 0,5%, extracto de levadura 0,1%, caseína hidroxilada 0,02%, MgSO₄ 0,8 mM, D/L triptófano 0.025% y L-Metionina 0,02%.

2.1.3. Transformación Bacteriana.

La transformación de *E. coli* se desarrolló siguiendo el método de choque térmico (Hanahan, 1983). Se mezclan 200 µl de células competentes con 10-100 ng del plásmido y se incuban a 4 °C durante 30 min. Después se da un choque térmico a 42 °C durante 1 min para que los poros de la membrana se abran y el ADN sea capaz de entrar al citosol. Seguidamente se mantienen las células en hielo durante 2 min para que la membrana se restablezca. Se plaquea en LB-Agar con el antibiótico seleccionador.

Para transformar *B. subtilis* se hace una dilución 1:10 de las células competentes en el medio GM2, se dejan 1h a 37°C en agitación, en este momento las células se encuentran en el pico de competencia, se mezclan 200 µl de las células con 100-200 ng del ADN y se dejan 30 min a 37°C, pasado este tiempo son transferidas a medio LB-agar con el antibiótico correspondiente (Bott y Wilson, 1968).

Medio GM2: GM1 más MgSO₄ 3,3 mM y CaCl₂ 0,5 mM

2.2. Manipulación del ADN

2.2.1. Purificación y cuantificación del ADN

El ADNcd plasmídico fue purificado por lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979) o bien utilizando el kit para purificación de ADN de Qiagen.

La concentración del ADN fue cuantificada por absorbancia a 260 nm y su pureza relacionando la absorbancia a 260 nm y 280 nm (Sambrook y col., 1989a).

2.2.2. Plásmidos

En la tabla 5 se detallan los plásmidos utilizados y/o contruidos en este trabajo.

Tabla 5. Plásmidos

Nombre	Derivado de	Descripción
pT712		Posee el promotor de ϕ 10 del fago T7 (GIBCO-BRL)
pET3a		Posee el promotor de ϕ 10 del fago T7 (GIBCO-BRL)
pET21b		Posee el promotor de ϕ 10 del fago T7 e introduce una secuencia para 6 histidinas en el extremo 3' del gen (GIBCO-BRL)

Nombre	Derivado de	Descripción
pDR111		Vector integrativo para <i>B. subtilis</i> , posee el promotor Hyperspank controlado por IPTG (Laboratorio de David Rudner)
pHP13		Vector lanzadera para <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i>
pHP14	pHP13	Vector lanzadera para <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i>
pBT346	pHP13	Lleva los genes: <i>orfδ</i> , <i>orfω</i> , <i>orfε</i> , <i>orfζ</i> . (Ceglowski y Alonso, 1993b).
pBT291	pT712	Lleva los genes: <i>orfδ</i> , <i>orfω</i> (en orientación <i>HindIII</i> - <i>EcoRI</i>). (Ceglowski y Alonso, 1993a).
pUC57	pUC19	Secuencia promotora del gen <i>copS</i> en orientación <i>HindIII</i> - <i>EcoRI</i> . (de la Hoz y col. 2000)
pCB30	pUC19	Secuencia promotora del gen <i>orfω</i> , en orientación <i>HindIII</i> - <i>EcoRI</i> . (de la Hoz y col. 2000)
pT712- ω	pT712	Plásmido para sobreproducir la proteína ω (de la Hoz y col. 2000)
pT712- $\omega\Delta 8$	pT712	Plásmido para sobreproducir la proteína $\omega_2\Delta 8$ (este trabajo)
pT712- $\omega\Delta 18$	pT712	Plásmido para sobreproducir la proteína $\omega_2\Delta 18$ (este trabajo)
pT712- $\omega\Delta 19$	pT712	Plásmido para sobreproducir la proteína $\omega_2\Delta 19$ (este trabajo)
pT712- $\omega\Delta 25$	pT712	Plásmido para sobreproducir la proteína $\omega_2\Delta 25$ (este trabajo)
pCB586	pHP14	Lleva la secuencia promotora de ω y el gen ω (este trabajo)
pCB590	pHP14	Lleva la secuencia promotora de ω y el gen ω sin los 8 codones que codifican los 8 primeros aminoácidos del N _T de la proteína ω (este trabajo)
pCB589	pHP14	Lleva la secuencia promotora de ω y el gen ω sin los 18 codones que codifican los 18 primeros aminoácidos del N _T de la proteína ω (este trabajo)
pCB742	pHP14	Lleva la secuencia promotora de ω y el gen ω sin los 19 codones que codifican los 19 primeros aminoácidos del N _T de la proteína ω (este trabajo)
pCB743	pHP14	Lleva la secuencia promotora de ω y el gen ω sin los 25 codones que codifican los 25 primeros aminoácidos del N _T de la proteína ω (este trabajo)
pCB744	pHP14	Lleva la secuencia promotora ω y el gen ω con una mutación puntual en el codón 38 que codifica una His por una Ala (este trabajo)
pCB745	pHP14	Lleva la secuencia promotora ω y el gen ω con una mutación puntual en el codón 29 que codifica una Thr por una Ala (este trabajo)
pCB746	pET21b	Plásmido para sobreproducir la proteína δ -His ₆ (este trabajo)
pCB747	pET21b	Plásmido para sobreproducir la proteína δ K36A-His ₆ (este trabajo)

Nombre	Derivado de	Descripción
pCB578	pHP13	Lleva la secuencia promotora de δ y el gen δ -gfp (este trabajo)
pCB703	pHP13	Lleva la secuencia promotora de δ , el gen δ -gfp, la secuencia promotora de ω y el gen $\omega\Delta 19$ (este trabajo)
pCB705	pHP13	La secuencia promotora de δ y el gen $\delta K36A$ -gfp (este trabajo)
pCB706	pHP13	Lleva la secuencia promotora de δ , el gen δ , la secuencia promotora de ω y el gen ω (este trabajo)
pCB702	pHP13	Lleva la secuencia promotora de δ , el gen δ -gfp, la secuencia promotora de ω y el gen ω (este trabajo)
pCB343	pUC19	Con tres repeticiones heptaméricas en orientación directa $5'(\rightarrow)_33'$
pCB251	pUC19	Con dos repeticiones heptaméricas directas y una invertida $5'(\rightarrow)_2\leftarrow 3'$
pCB345	pUC19	Lleva cuatro repeticiones heptaméricas directas $5'(\rightarrow)_43'$.
pCB344	pUC19	Lleva cuatro repeticiones heptaméricas, dos directas y dos invertidas $5'(\rightarrow)_2(\leftarrow)_23'$.
pCB429	pUC19	Lleva dos repeticiones heptaméricas directas, una invertida y la última directa $5'(\rightarrow)_2\leftarrow\rightarrow 3'$.
pCB426	pUC19	Con dos repeticiones heptaméricas, separadas por un par de bases, $5'(\rightarrow)[A]\rightarrow 3'$
pCB533	pUC19	Con dos repeticiones heptaméricas, separadas por un par de bases, $5'(\rightarrow)[AT]\rightarrow 3'$
pCB427	pUC19	Con dos repeticiones heptaméricas, separadas por un par de bases, $5'(\rightarrow)[ATA]\rightarrow 3'$
pCB428	pUC19	Con dos repeticiones heptaméricas, separadas por un par de bases, $5'(\rightarrow)[ATAG]\rightarrow 3'$
pCB537	pUC19	Dos repeticiones directas, en la primera ($5'$), se muta la primera base cambiando la A/T por una C
pCB538	pUC19	Dos repeticiones directas, en la primera ($5'$) se muta la primera base cambiando la A/T por una G
pCB438	pUC19	Dos repeticiones directas, en la primera ($5'$) se muta la segunda base (A) por una T
pCB439	pUC19	Dos repeticiones directas, en la primera ($5'$) se muta la segunda base (A) por una G
pCB440	pUC19	Dos repeticiones directas, en la primera ($5'$) se muta la segunda base (A) por una C .
pCB501	pUC19	Dos repeticiones directas, en la primera ($5'$) se muta la tercera base (T) por una A

Nombre	Derivado de	Descripción
pCB502	pUC19	Dos repeticiones directas, en la primera (5') se muta la tercera base (T) por una C
pCB515	pUC19	Dos repeticiones directas, en la primera (5') se muta la tercera base (T) por una G
pCB518	pUC19	Dos repeticiones directas, en la primera (5') se muta la cuarta base (C) por una A
pCB482	pUC19	Dos repeticiones directas, en la primera (5') se muta la cuarta base (C) por una G
pCB521	pUC19	Dos repeticiones directas, en la primera (5') se muta la cuarta base (C) por una T
pCB522	pUC19	Dos repeticiones directas, en la primera (5') se muta la quinta base (A) por una C
pCB479	pUC19	Dos repeticiones directas, en la primera (5') se muta la quinta base (A) por una G
pCB480	pUC19	Dos repeticiones directas, en la primera (5') se muta la quinta base (A) por una T
pCB443	pUC19	Dos repeticiones directas, en la primera (5') se muta la sexta base (C) por una A
pCB442	pUC19	Dos repeticiones directas, en la primera (5') se muta la sexta base (C) por una G
pCB444	pUC19	Dos repeticiones directas, en la primera (5') se muta la sexta base (C) por una T
pCB446	pUC19	Dos repeticiones directas, en la primera (5') se muta la séptima base (A/T) por una C
pCB445	pUC19	Dos repeticiones directas, en la primera (5') se muta la séptima base (A/T) por una G

2.2.3. Marcaje radiactivo de fragmentos de ADN.

2.2.3.1. Marcaje de fragmentos con extremos 5' protuberantes

Los fragmentos de ADN, con uno o los dos de sus extremos 5' protuberantes, fueron marcados mediante la incubación del ADN con fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* en presencia de 250 μ M de dCTP, dGTP, dTTP y [α^{32} P]dATP, durante 15 min a temperatura ambiente. El resto de nucleótidos no incorporados se eliminan de la muestra filtrándola a través de una columna de Sephadex G-50.

2.2.3.2. Obtención y purificación de los fragmentos de ADN utilizados para los distintos ensayos de interacción proteína-ADN.

a) Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN mayores de 100 pb.

Para obtener la región promotora del gen *copS*:

Para la obtención de ADN que fue utilizado en ensayos de retraso en gel y de DNasa I, se digirió el plásmido pUC57 con las enzimas de restricción *Hind*III y *Kpn*I, de esta manera queda el extremo 5' protuberante en la cadena de arriba. La digestión, antes de ser marcada radiactivamente, fue cargada en un gel de agarosa del 0,8 % y la banda correspondiente al fragmento de ADN que se correspondía al promotor del gen *copS*, se purificó del gel. Posteriormente se marcó usando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, [α 32 P]dATP y el resto de dNTPs fríos.

Para obtener la región promotora del gen ω :

Para obtener un fragmento de ADN que contenga la región promotora del gen ω , con el extremo 5' protuberante en la cadena de arriba, lo que se hace es digerir el plásmido pCB30 con las enzimas de restricción *Hind*III y *Kpn*I; la digestión se carga, como en el caso anterior en un gel de agarosa al 0,8% y la banda de ADN, que tiene un tamaño de 423 pb, se purifica y posteriormente se marca radiactivamente (en la cadena de abajo).

b) Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN menores de 100 pb.

Para el aislamiento y purificación de los fragmentos de ADN que llevan las distintas variaciones en las repeticiones. Se digirieron los distintos plásmidos portadores tanto, de las diferentes variaciones numéricas en las repeticiones heptaméricas, como de las mutaciones puntuales, con *Hind*III y *Eco*RI, en el caso de querer que las dos cadenas del fragmento de ADN estuviese marcado. Se digirieron con *Eco*RI y *Sph*I, para que quedara al extremo 5' protuberante en la cadena de abajo, y de esta manera obtendremos los distintos fragmentos de ADN marcados en la cadena de arriba. Si lo que se deseaba era marcar la cadena de abajo, lo que se hizo fue digerir con *Hind*III y *Kpn*I, de esta manera el 5' protuberante queda en la cadena de arriba. En cualquiera de los tres casos explicados en este apartado, después de las distintas digestiones se obtienen fragmentos de ADN que no superan en longitud las 89 pb, debido al tamaño tan pequeño de los fragmentos de ADN, lo que se hizo en estos casos fue marcar radiactivamente todo el ADN digerido y después de resolver las bandas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% TBE 0,5 X, se aisló la banda. Una vez aislada la banda, el ADN se eluye de la poliacrilamida incubando esta durante toda la noche en agitación y a temperatura ambiente en una solución de elución con 0,5 M de NH_4Ac , 0,1% de SDS y 1 mM de EDTA, una vez eluido se precipita añadiendo acetato sódico una concentración final de 0,3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto.

2.2.4. Mutagénesis dirigida.

Para realizar las mutaciones puntuales (ω H38V y δ K36A) se utilizó un sistema de doble amplificación por PCR:

- en la primera PCR se utilizó como molde la secuencia del gen en el que se quería introducir la mutación puntual. Se hicieron dos PCR, una utilizando como cebadores un oligonucleótido externo que anilla aguas arriba del gen y otro interno que contiene la mutación que se desea. Para la segunda PCR se utiliza como cebadores el oligonucleótido interno complementario al que tenía la mutación y otro externo que anilla aguas abajo del gen.
- en la segunda PCR se utiliza como molde los fragmentos de ADN obtenidos con la primera PCR y como cebadores a los oligonucleótidos externos. De esta manera se obtuvo un gen que llevaba la mutación puntual.

2.3. Obtención y estudio de proteínas

2.3.1. Sobreproducción de proteínas.

Los genes que codifican las proteínas ω_2 , $\omega_2\Delta 8$, $\omega_2\Delta 18$, $\omega_2\Delta 19$, $\omega_2\Delta 25$, δ_2 , $(\delta\text{-His}_6)_2$ y $(\delta\text{K36A-His}_6)_2$ se clonaron en pT712 (GIBCO-BRL) bajo la expresión del promotor $\phi 10$ del fago T₇ para su sobreproducción. Este promotor es únicamente reconocido por la ARN polimerasa del fago. De esta manera se pueden sobreexpresar genes y por lo tanto sobreproducir las proteínas codificadas de manera muy efectiva. (Studier y col, 1990).

El hospedador empleado para la transformación de estos plásmidos fue la estirpe *E. coli* BL21(DE3)[pLysS]. El bacteriófago DE3, que es un derivado del fago λ que posee el gen *lacI*, el promotor *lacUV5*, y el gen de la ARN polimerasa de T₇ está integrado en el genoma de BL21. La cepa BL21 es un derivado de *E. coli* que carece de la proteasa LonA. En la cepa BL21(DE3) el gen de la ARN polimerasa se expresa a partir del promotor *lacUV5*, que es inducible por IPTG (1 mM), que se añade al cultivo cuando este se encuentra a una $\text{DO}_{560}=0,8$. Así, mediante la adición de IPTG, que se deja induciendo la síntesis de ARN polimerasa de T₇ durante 20 min y la posterior adición e incubación durante 2 hr con Rifampicina (200 $\mu\text{g/ml}$), se inhibe la transcripción de la ARN polimerasa celular, pero no la de T₇, de esta manera pueden expresarse de forma eficiente los genes que se hayan clonado en pT712.

Aquellos genes cuyos productos son tóxicos para la célula no pueden ser expresados en BL21(DE3), porque el nivel basal de la actividad de la ARN polimerasa puede promover la transcripción en la célula no inducida. Un modo de reducir este nivel basal es introduciendo un plásmido cofidicante del gen 10 de T₇ (pLysS). El producto del gen 10 de T₇ secuestra selectivamente a la ARN polimerasa de T₇. El plásmido pLysS lleva el gen de resistencia a cloranfenicol (Studier y col, 1990).

2.3.2. Purificación de proteínas.

2.3.2.1. Purificación de las proteínas ω_2 , $\omega_2\Delta 8$, $\omega_2\Delta 18$, $\omega_2\Delta 19$, $\omega_2\Delta 25$.

Una vez obtenida masa celular en la cual las distintas proteínas habían sido sobreproducidas según el sistema, ya descrito, del promotor $\phi 10$ del fago T₇, las células fueron centrifugadas durante 15 min a 9.000 rpm y posteriormente resuspendidas en el tampón A (fosfato sódico pH 7,5 50 mM, glicerol 10%) con 100 mM de NaCl, en una proporción de 5 ml/g de biomasa húmeda. Una vez obtenida una suspensión homogénea se lisan con la prensa de French a 1500 psi. Las células lisadas se centrifugaron, a 18000 rpm y a 4⁰ C, en rotor Sorvall GSA. Todas las variantes de ω_2 son solubles.

Se midió la absorbancia a 260 nm del sobrenadante de la lisis y a continuación se añadió PEI hasta una concentración final de 0,25%, cuando DO₂₆₀=120, y se centrifugó a 13000 rpm, a 4⁰ C, durante 15 min en rotor Sorvall SS-34; las proteínas de interés permanecen en el sobrenadante.

Se hizo una precipitación al 50% de sulfato amónico (SA) donde precipitan las proteínas que seguimos, salvo la variante $\omega_2\Delta 25$ que precipita al 80% SA. Se diluyó el precipitado de SA para obtener una solución con fuerza iónica correspondiente a 50 mM NaCl. Las proteínas se cargaron en una matriz de fosfocelulosa previamente activada y equilibrada con tampón A conteniendo 50 mM de NaCl. La proteína ω_2 y todas las variantes se comportaron de igual manera y se quedaron retenidas en la matriz, que posteriormente lavamos con concentraciones crecientes de NaCl, en todos los casos las proteínas eluyeron a 200 mM de NaCl. Una vez eluidas se bajó la concentración de sal hasta 100 mM para cargarlas en una columna conteniendo la matriz SP-Sepharosa equilibrada a 100 mM de NaCl. Las proteínas quedan retenidas y se lavó la matriz con concentraciones crecientes de sal. Las proteínas comenzaron a eluir a 175 mM de NaCl, libres de contaminantes pero muy diluidas por lo que hubo que

pegarla de nuevo a una matriz de fosfocelulosa, de muy poco volumen, de nuevo a 50 mM NaCl, para concentrarla. Una vez cargada toda la proteína en la segunda columna de fosfocelulosa se eluye mediante un golpe de sal a 300 mM de NaCl, se añade glicerol al 50% y se almacena a -20°C .

La concentración de cada proteína fue determinada por absorbancia mediante los coeficientes de absorción de $A_{1\%,1\text{cm}} = 3,63, 4,01, 4,77, 4,8$ y $0,548$ para ω_2 , $\omega_2\Delta 8$, $\omega_2\Delta 18$, $\omega_2\Delta 19$, $\omega_2\Delta 25$, respectivamente.

(<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)

Los diferentes pasos de purificación fueron seguidos por electroforesis en geles de SDS-PAGE al 17.5%.

2.3.2.2. Purificación de δ_2 , $(\delta\text{-His}_6)_2$ y $(\delta\text{K36A-His}_6)_2$.

En colaboración con el grupo Dr. Saenger, se purificó la proteína δ_2 . Fue sobre-expresada en *E. coli* BL21(DE3) y purificada utilizando columnas de heparina, de intercambio iónico, y añadiendo un paso de filtración en gel.

Para facilitar la purificación de variantes de esta proteína, se decidió añadir a la proteína silvestre una cola de 6 histidinas ($\delta\text{-His}_6$). Las células se lisaron en tampón A. Los restos celulares fueron eliminados por centrifugación. El sobrenadante de lisis se cargó en una columna de Ni-NTA, se lavó a concentraciones bajas de imidazol y finalmente la proteína fue eluida a imidazol 50 mM. El eluido de la resina de Ni se cargó en una columna Q-Sepharosa equilibrada con tampón A y NaCl 50 mM. Una vez lavada la columna se eluyó la proteínas a 200 mM de NaCl. La proteína pura se dializó frente a fosfato sódico pH 7,5 50 mM, 50% glicerol, NaCl 100 mM y se conservó -20°C .

Se hicieron ensayos bioquímicos en paralelo con las dos proteínas y se comprobó que tenían las mismas actividades, en el mismo rango de concentraciones.

Se construyó el mutante $\delta\text{K36A-His}_6$ y se purificó siguiendo el mismo protocolo.

La concentración de cada proteína fue determinada por absorbancia mediante los coeficientes de absorción de $A_{1\%,1\text{cm}} = 0,887, 0,857, 0,858$ para δ_2 , $(\delta\text{-His}_6)_2$ y $(\delta\text{K36A-His}_6)_2$ respectivamente.

2.3.3. Ensayo de unión covalente entre proteínas

El estado oligomérico de las proteínas se realizó por entrecruzamiento utilizando el bis (*N*-hydroxysuccinimide ester) disuccinimidyl suberato o ácido subérico (DSS) como agente químico de unión. El DSS forma uniones covalentes entre aminas primarias situadas a menos de 11, 8 Å de distancia. Las proteínas se incubaron en tampón B (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl), y en presencia o ausencia de ATP o en presencia de ADP 1 mM 37 °C durante 5 min. Se le añadió entonces el DSS y se incubó 10 min más a 37°C. La reacción se paro con tampón de ruptura y las muestras se resolvieron en geles SDS-PAGE del 10% para δ_2 o del 17,5% para ω_2 y sus variantes.

2.4. Ensayos bioquímicos

2.4.1. Medida de interacciones proteína-ADN

2.4.1.1. Ensayos de retraso en gel.

La interacción proteína-ADN fue medida por la variación de la movilidad de un ADN marcado cuando está libre o cuando forma un complejo más o menos estable con una o varias proteínas. Los fragmentos de ADN marcados radiactivamente fueron incubados con distintas concentraciones de las proteínas en tampón B durante 15 min a 37° en 20 μ l de volumen final. En el caso de los ensayos con δ_2 se añadió ATP o ADP 1 mM.

Las mezclas de reacción con tampón de carga fueron cargadas en geles nd-PAGE del 8% en el caso de fragmentos de ADN pequeños, y del 4% en caso de fragmentos de más de 300 pb. Los geles se corrieron en 0,5X Tris-borato-EDTA (TBE) (Sambrook y col., 1989b) para los ensayos con ω_2 y en 1X TAE para los ensayos con δ_2 , a 4°C, a 200 V durante 2 horas y fueron secados y autoradiografiados.

Para obtener los valores de $k_{d,app}$ de los geles de retrasos y de los ensayos de protección a DNasa I, las concentraciones del ADN libre y de los complejos ADN-proteína fueron determinados por densitometría de las autoradiografías. La concentración de proteína que transfiere el 50% del [³²P]-ADN en complejos o que protege el 50% del [³²P]-ADN de la digestion por DNasa I es aproximadamente la constante de disociación ($k_{d,app}$).

2.4.1.2. Ensayos de protección a DNasa I.

En este caso la interacción ADN-proteína se mide por la capacidad de la proteína que se une al ADN de proteger la región a la cual se une del ataque de la enzima DNasa I. La protección se visualiza como una “huella” en el ADN que marca la zona a la que se unió la proteína de interés.

Las condiciones de reacción para el ensayo de protección a DNasa I fueron las mismas que para los ensayos de retraso. La concentración de ADN utilizada es de entre 0,5 y 1 nM. Luego de la incubación se añade DNasa I, previamente calibrada. Se considera como óptima la cantidad suficiente como para que cada molécula de ADN sea cortada por término medio una vez. Se dejó actuar 5 min a 37°C. La reacción se paró añadiendo EDTA hasta una concentración final de 25 mM. El ADN fue precipitado con acetato sódico 0,3 M y etanol frío. Las muestras fueron resuspendidas en tampón de carga desnaturizante [80% (v/v) formamida, 0,1 % (v/v) azul de bromofenol y 0,1% (v/v) xilenecianol], separadas en un gel desnaturizante de poliacrilamida del 6 o del 15% (dPAGE) y luego autoradiografiados. Como marcador de tamaño, se obtuvieron patrones utilizando la reacción química de secuenciación (G+A) con los mismos fragmentos de ADN que se utilizaron en el experimento.

2.4.1.3. Ensayos de protección al ataque de agentes químicos.

Los ensayos de protección del ADN al ataque de agentes químicos (radical hidroxilo) fueron realizados de acuerdo a lo descripto previamente (Tullius y Dombroski, 1986). Los fragmentos de *HindIII-KpnI* o *EcoRI-SphI* de [^{32}P]-ADN (2 nM) se incubaron con diferentes concentraciones de la proteína ω_2 en un volumen final de 20 μl in tampón B. Luego de 15 min de incubación a 37°C, se inicia el ataque de radical hidroxilo mediante la adición de 3 μl de una solución recién preparada de 4 mM EDTA, 2 mM hierro (II) amonio-sulfato hexahidratado, 14 mM ascorbato de sodio y 1.5% H_2O_2 . Luego de 4 min. la reacción se detiene con la adición de 2 μl de tiourea 100 mM y 2 μl EDTA 0.5 M. Las muestras se diluyeron 1:1 con agua y el ADN se precipita con acetato sódico 0,3 M y etanol frío. Las muestras fueron resuspendidas en tampón de carga [80% (v/v) formamida, 0,1 % (v/v) azul de bromofenol y 0,1% (v/v) xylene cyanol], separadas en un gel desnaturizante de poliacrilamida del 15% (dPAGE) y luego autoradiografiados.

Para el analizar la intensidad de las bandas se utilizó el programa Quantity One. Se tomaron bandas al azar fuera de la zona de protección para obtener un valor de normalización para corregir errores de cargado.

2.4.2. Medida de la actividad ATPasa

La actividad ATPasa de δ_2 se midió por cromatografía en capa fina.

Se incubaron las proteínas y el ADN a 37°C en tampón B con una concentración total de ATP de 0,01 mM. La relación ATP/[$\gamma^{32}\text{P}$]- ATP fue de 1/10000.

A los tiempos indicados se fue retirando muestra y se sembró en un folio plástico de PEI-celulosa para cromatografía de capa fina. Se desarrolló la cromatografía con tampón C (fosfato potásico 0,85 M), se secó y se expuso en una pantalla de phosphorimager. Se escaneó y se cuantificó con el programa Quantity One, la marca correspondiente al fósforo inorgánico liberado después de la hidrólisis de ATP y la marca que corresponde al ATP. Se siguió la reacción hasta 180 min. En todos los casos se inicia la reacción con la presencia de δ_2 y del ATP.

2.4.3. Dispersión de la luz

En colaboración con el grupo del Dr. Saenger se realizaron experimentos de dispersión dinámica de la luz, DLS (del inglés *Dynamic Light Scattering*).

El plásmido linearizado pUC57, fue incubado con las proteínas δ_2 , ω_2 y $\omega_2\Delta 19$, durante 2 min en hielo en tampón B. Se añadió entonces uno de los nucleótidos (ATP, ADP o ATP γ S 1 mM) y se midió la luz dispersa en unidades arbitrarias cada 30 seg los primeros 5 min y luego cada 2 min. Se utilizó para estos experimentos un Laser Spectroscatter 201.

2.4.4. Ensayos de centrifugación

Este ensayo fue utilizado para determinar si se formaban complejos lo suficientemente grandes como para precipitar a bajas velocidades.

Se centrifugaron las proteínas que se iban a utilizar (δ_2 , ω_2 , $\omega_2\Delta 19$) durante 30' a 20.000g para eliminar cualquier agregado que pudiera haber. Se incubaron las proteínas con el ADN en tampón B con o sin ATP en un volumen de 20 μl durante 15 min a 37 °C. Se centrifugaron a 20.000 g durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en el mismo volumen. Se añadió tampón de ruptura y se cargaron los precipitados y los sobrenadantes en geles SDS-PAGE del 12% o del 17,5%.

2.5. Ensayos *in vivo*

2.5.1. Ensayos de estabilidad del plásmido

Las células de *B. subtilis* con el plásmido que se deseaba estudiar, fueron crecidas en LB suplementado con antibiótico (Cm) a 30 °C durante toda la noche, en agitación. El cultivo fue diluido hasta una OD₅₆₀ de 0,05 e inoculado en medio fresco sin antibiótico. Luego de crecer durante 8 hs a 30 °C (~ 5 generaciones), se volvió a diluir el cultivo en medio pre-calentado sin antibiótico y se incubó toda la noche (~ 15 generaciones). Así se repitió el ciclo hasta llegar a 100 generaciones. Se fueron tomando muestras cada 20 generaciones, se plaquearon en LB diluciones adecuadas del cultivo. Las placas se incubaron a 30 °C toda la noche y al día siguiente se contaron las colonias. La placa de LB se replicó en una placa de Cm y se incubó a 30°C toda la noche. Se contaron las colonias de la placa con antibiótico y se compararon con las que crecieron en LB. La diferencia son las células que perdieron el plásmido.

Para calcular la tasa o frecuencia de pérdida del plásmido utilizamos la fórmula: $L=1-(P)^{1/n}$ donde P es el porcentaje de células que retienen el plásmido y n es el número de generaciones.

Se hizo el mismo experimento en Medio Mínimo S7 (MMS7) para *B. subtilis* pero no se apreciaron diferencias, por ello se continuó trabajando con LB.

MMS7: MOPS 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, Fosfato potásico 5 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 0,7 mM, ZnCl₂ 1 µM, MnCl₂ 50 µM, Fructosa 1%, glutamato 0,1%, D/L triptofano 0.04 % y L-Metionina 0,04 %.

2.5.2. Medida de la actividad β-Galactosidasa

A partir de un cultivo de *B. subtilis* saturado, se hace una dilución 1:100 en LB, una vez que alcanza una DO₅₆₀=0,6, se recogen alícuotas de 100 µl a distintos tiempo, a dichas alícuotas se les añade 0,9 ml de tampón Z (Fosfato sódico 0,1 M, Kcl 10 mM, MgSO₄ 1 mM, β-Mercaptoetanol 50 mM). Las células son lisadas mediante la adición de 25 µl de SDS al 0,1% y 25µl de cloroformo y agitación vigorosa durante 10 segundos. Una vez dejado reposar durante unos minutos (hasta que se pierde la turbidez), se inicia la reacción colorimétrica tras la adición de 200 µl de una solución 4 mg/ml de 2-nitrofenil-β-galactopiranosido (ONPG) en tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,0 y se incuba a temperatura ambiente hasta que el color amarillo resultante se encuentra en un rango DO₄₂₀ de entre 0,6 y 0,9. La reacción se detiene al añadir 0,5 ml de Na₂CO₃ 1M (Miller, 1972).

Las unidades Miller de actividad se calculan usando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades de } \beta\text{-Galactosidasa} = 1000 \times \frac{A_{420} - (1,75 \times A_{550})}{t_{(\text{min})} \times V_{(\text{ml})} \times A_{600}}$$

A_{420} y A_{550} : absorbancia a las longitudes de ondas indicadas de la reacción colorimétrica.

t : tiempo de reacción en minutos, desde el momento de adición del sustrato hasta que la reacción se detiene.

V : volumen de cultivo utilizado en ml.

A_{600} : absorbancia del cultivo en el momento de realizar la determinación.

2.6. Microscopía

2.6.1. Microscopía de fluorescencia

Se utilizó esta técnica para visualizar proteínas fusionadas a la GFP (del inglés *green fluorescent protein*). La proteína GFP necesita más tiempo para plegarse correctamente por ello es frecuente crecer las células lentamente las células que van a ser visualizadas.

Las células fueron crecidas durante toda la noche en MMS7, diluidas hasta 0,05 OD₅₆₀ e incubadas en agitación a 30°C. A las cepas BG947 y BG949 (que llevan el gen $\delta\text{-gfp}$ y $\delta K36A\text{-gfp}$ clonado bajo el promotor Hyperspank inducible por IPTG) se les añadió IPTG cuando llegaron a OD₅₆₀: 0,2. Cuando las células llegaron a una OD₅₆₀ ~ 0,6, las células se fijaron. Se tomó 1 ml del cultivo y se fijó con paraformaldehído al 4% concentración final. Se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se centrifugó durante 10 s a alta velocidad. Se lavó el precipitado y se resuspendieron en PBS 1X.

Se han utilizado dos métodos para fijar las células al portaobjetos: (i) se trata el portaobjetos con polilisina al 10% y se deja secar toda la noche a temperatura ambiente o 1 h a 60°C. Las células fijadas se añaden directamente sobre el portaobjetos tratado con polilisina y (ii) Se prepara sobre los portaobjetos una fina capa de agarosa 1%. Se deja secar y se añaden las células. En ambos casos, justo antes de cubrir las células se añadió DAPI a una concentración final de 0,2 µg/ml y medio de montaje para fluorescencia. Finalmente se colocó el cubreobjetos.

Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio Olympus BX61 con una cámara Olympus DP70 colour CCD. El microscopio posee una platina motorizada que permitió realizar pilas de imágenes en el eje Z, con cortes cada 100 nm. Las imágenes así obtenidas y otras imágenes 2D, fueron procesadas con el programa de deconvolucion Huygens Professional (Scientific Volume Imaging).

Con *E. coli* el procedimiento fue el mismo salvo que en vez de usar MMS7 se utilizó M9. Para visualizar las células vivas se crecieron las células de la misma manera que para fijarlas pero en este caso se tomó una alícuota del cultivo a una $OD_{560} \sim 0,6$ y directamente se centrifugó y una vez resuspendidas se colocan sobre el portaobjetos con azarosa 1% preparada en medio mínimo. Se taparon las células con el cubreobjetos e inmediatamente se miraron las muestras en el microscopio. Se tomaron imágenes a determinados intervalos de tiempo.

2.6.2. Microscopía electrónica

Se utilizó esta técnica para visualizar los complejos que las diferentes proteínas estudiadas forman con el ADN.

El plásmido pCB30 linearizado se incubó con las proteínas de interés durante 15 min a 37°C y luego se trató de dos formas diferentes:

(i) Tinción Negativa: Se coloca la muestra sin fijar sobre mica que tiene una capa fina de carbón, se trata con acetato de uranilo 1%. Con esta técnica es posible observar a las proteínas a gran magnificación, si forman estructuras o no. No se puede ver el ADN.

(ii) Adsorción a mica: Se fijan las reacciones con glutaraldehído al 0,2% durante 10 min a temperatura ambiente. Luego se coloca la muestra sobre mica. Se trata con 1% acetato de uranilo y se le pulveriza por encima platino y carbón. Esta técnica es especial para ver el ADN y complejo ADN-proteína.

Las muestras fueron analizadas en un microscopio electrónico Philips EM400T. La medida del contorno de las moléculas se realizó con el programa NIH ImageJ.

∴ RESULTADOS ∴

1. Interacción de la proteína ω_2 con el ADN

1.1. La proteína ω_2 se une a repeticiones en diferente orientación

En el plásmido pSM19035, aguas arriba de los genes *copS*, δ y ω se encuentran 10, 9 y 7 copias de la repetición de 7 pares de bases 5'^A/TATCAC^A/T3' (Figura 5A). Estas repeticiones son el probable sitio de unión de la proteína ω_2 (de la Hoz y col., 2000).

Para determinar cuál era el sitio mínimo de unión de ω_2 y por cuál organización de las repeticiones presentaba mayor afinidad, se estudió la formación de complejos de ω_2 con fragmentos de ADN conteniendo desde una hasta cuatro repeticiones en diferentes orientaciones (Figura 7). No se pudo detectar unión de ω_2 a fragmentos de ADN conteniendo solo una repetición definiéndose dos repeticiones de 7 pares de bases como la mínima secuencia de unión y que cada heptámero representa un subsitio.

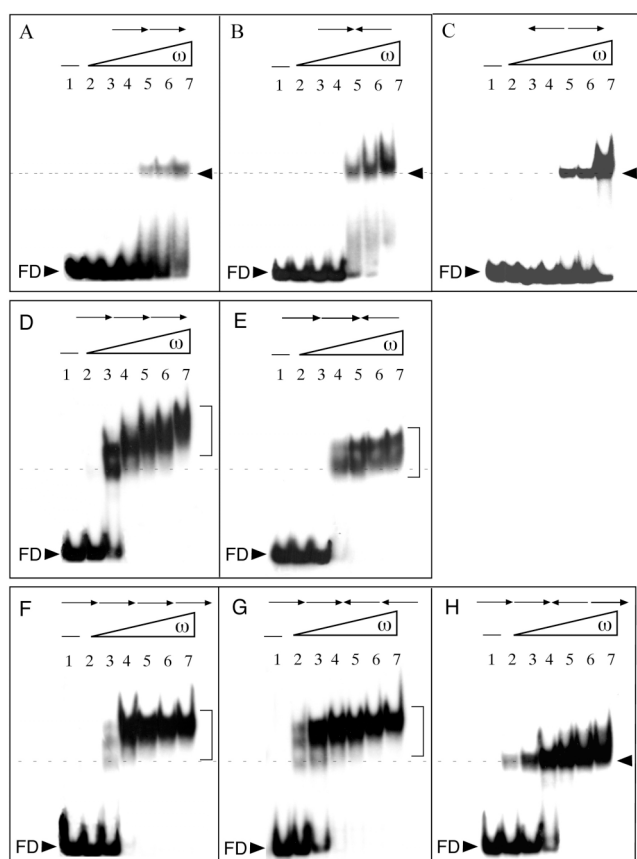


Figura 7. Interacción de la proteína ω_2 con ADN conteniendo de dos a cuatro repeticiones en diferente orientación. Los fragmentos de ADN [α^{32} P]-*HindIII*-*KpnI* de 59-pb (A, B and C, dos repeticiones), 66-pb (D y E, tres repeticiones) y 73-pb (F, G y H, cuatro repeticiones) (0,2 nM) fueron incubados con concentraciones crecientes de ω_2 en tampón B durante 15 min a 37°C. Los complejos ω_2 •ADN fueron analizados por retraso en gel. Las flechas en la parte superior de cada panel indican el número y la orientación de las repeticiones de 7-pb. Las cabezas de flecha o los corchetes a la derecha indican el tipo(s) de complejos formados. La línea de puntos indica la movilidad de los complejos formados a baja concentración de proteína. Excepto en el panel (C) las concentraciones de ω_2 son 4, 8, 16, 32, 64 y 128 nM (calles 2 a 7, respectivamente). En el panel C las concentraciones de ω_2 son 8, 16, 32, 64, 128 y 256 nM. El símbolo - en la primera calle indica la ausencia de proteína.

La concentración de ω_2 necesaria para acomplejar el 50% del ADN presente en la reacción parece ser menor para ADN con dos repeticiones en orientación cabeza-cabeza ($\rightarrow\leftarrow$) que

cuando están orientadas de forma directa ($\rightarrow\rightarrow$) o inversa ($\leftarrow\leftarrow$). Las constantes aparentes de disociación ($k_{d,app}$) son 20, 90 y 120 nM respectivamente (Tabla 6). Con dos repeticiones solo se observa una banda retrasada a todas las concentraciones de ω_2 en este experimento. La afinidad de la proteína ω_2 por ADN con tres o cuatro repeticiones ($k_{d,app}$ entre 6 y 14 nM) es similar a la que presenta por los sitios completos de unión presentes en el plásmido ($k_{d,app}$ 4-12 nM) (de la Hoz y col., 2000) (Figura 7). En presencia de tres o cuatro repeticiones (excepto en la orientación $\rightarrow_2\leftarrow\rightarrow$) (Fig. 7H) se observan complejos de mayor orden a medida que aumenta la concentración de proteína. La heterogeneidad de estos complejos sugiere una ocupación progresiva del sitio de unión por la proteína ω_2 .

Tabla 6. Unión de ω_2 a repeticiones en diferente número y orientación ($k_{d,app}$ en nM de ω_2)

Orientación y número de repeticiones	EMSA	DNasa I
\rightarrow	> 500	> 500
\rightarrow_2	~ 90	~ 25
$\rightarrow\leftarrow$	~ 20	~ 25
$\leftarrow\rightarrow$	~ 120	~ 140
\rightarrow_3	~ 12	~ 12
$\rightarrow_2\leftarrow$	~ 12	~ 12
\rightarrow_4	~ 8	~ 7
$\rightarrow_2\leftarrow_2$	~ 6	~ 8
$\rightarrow_2\leftarrow\rightarrow$	~ 14	~ 14
$(\rightarrow_2\leftarrow)_3 \rightarrow (P_{cop})$	~ 9	~ 10

1.2. La proteína ω_2 protege grandes segmentos de ADN de la digestión por DNasa I

Para estudiar el efecto de ω_2 en la protección de fragmentos de ADN conteniendo de 2 a 4 repeticiones, los complejos ADN• ω_2 fueron analizados por protección a DNasa I. Se observó que son protegidas regiones discretas de ADN, mayores que las correspondientes a la secuencia de las repeticiones. En la orientación $\rightarrow\rightarrow$ aparece protegida una región de ~18 pb (Figura 8A), ~22 pb para $\rightarrow\leftarrow$ (Figura 8B), ~28 pb para $\rightarrow_2\leftarrow$ (Figura 8D) y \rightarrow_3 (Figura 8E), y ~36 pb para \rightarrow_4 (Figura 8G). La protección se extiende hacia los extremos 5' del ADN de cadena doble. Como se muestra en la Figura 4C y H, las regiones protegidas del ataque por DNasa I son mas pequeñas que las que ocupan las series de repeticiones, protegiéndose solo ~12 pb del ADN con repeticiones en la orientación $\leftarrow\rightarrow$ y ~26 pb cuando están presentes en la orientación $\rightarrow_2\leftarrow\rightarrow$. En este último caso la región 5' que comprende las tres primeras repeticiones está protegida no así la cuarta repetición.

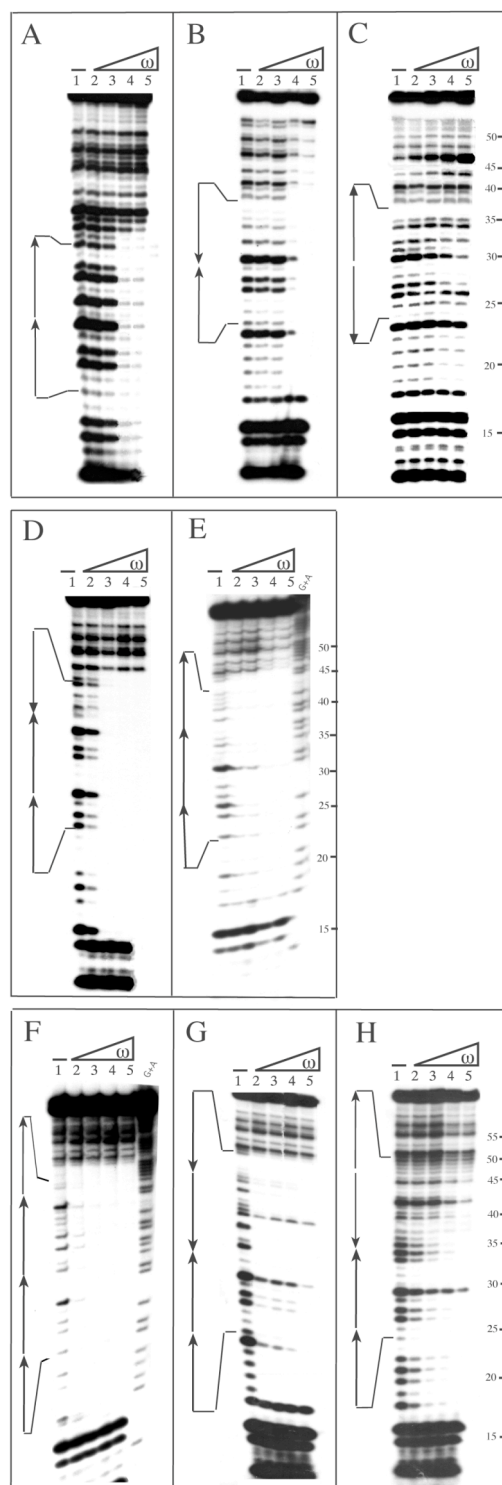


Figura 8. Experimento de protección a DNasa I con los complejos ω_2 -ADN

Fueron utilizados los fragmentos de ADN [$\alpha^{32}\text{P}$]-*Hind*III-*Kpn*I descritos en la Fig.2. Las flechas indican el número, ubicación y orientación de las repeticiones. [$\alpha^{32}\text{P}$]-ADN (1 nM) fue incubado con concentraciones crecientes de ω_2 en tampón B durante 15 min a 37°C, luego se digirió con DNasa I. Excepto en el panel (C) las concentraciones de ω_2 son 8, 16, 32 y 64 nM (calles 2 a 5, respectivamente). En el panel C las concentraciones de ω_2 son 32, 64, 128 y 256 nM. El símbolo – en la primera calle indica la ausencia de proteína. Las calles indicadas como G+A a la derecha de los paneles (E) y (F) fueron realizadas mediante la reacción de Maxam-Gilbert y se utilizan como marcador de tamaño. Los números a la derecha de los paneles C, E y H se refieren a la posición de los nucleótidos en la secuencia del ADN estudiado.

La protección de zonas en donde no están presentes las repeticiones es probablemente debido a interacciones inespecíficas de la proteína ω_2 con el ADN cuando forma parte de un complejo núcleoproteico grande. La protección de ω_2 fue cuantificada y se une con similar afinidad a dos repeticiones en orientación $\rightarrow\leftarrow$ y \rightarrow_2 ($k_{d,app} \sim 25$ nM) y a tres o cuatro repeticiones ($k_{d,app}$ 5-12 nM) (Tabla 6). La diferencia en la afinidad de ω_2 por dos repeticiones

en forma directa (\rightarrow_2) calculada por ensayos de retraso y de protección a la DNasa I, puede deberse a las condiciones de la electroforesis en el ensayo de retraso.

Utilizando técnicas de resonancia del plasmón (BIAcore) se llegó a las mismas conclusiones. Además se ha confirmado que la unión es altamente cooperativa y que la vida media del complejo ω_2 •ADN se menor a 2 minutos (de la Hoz y col., 2004).

1.3. Reconocimiento selectivo de la secuencia de ADN

Para determinar cuáles eran los nucleótidos relevantes en la unión proteína-ADN, se substituyó cada par de bases en la primera repetición de un sitio de unión consistente en dos repeticiones directas \rightarrow_2 , mientras que la segunda repetición no fue modificada (Tabla 7). Se determinó la $k_{d,app}$ por protección a DNasa I. El cambio de una A o una T en la posición 1 o 7 por cualquier otra base, no afecta la unión de ω_2 al ADN. El reemplazo de A \rightarrow T o A \rightarrow G en la posición 2 parece no afectar la unión, pero el cambio A \rightarrow C reduce 8 veces la protección de ω_2 del ataque de la DNasa I (Tabla 7). El reemplazo T \rightarrow G en la posición 3, C \rightarrow A o C \rightarrow G en la posición 4, y A \rightarrow G o A \rightarrow T en la 5 o el cambio de una C de la posición 6 por cualquier otra base, reduce la afinidad de ω_2 por el ADN en aproximadamente 7 veces. Otras combinaciones muestran una afinidad intermedia (Tabla 7).

Estos resultados sugieren que la secuencia central 5'-ATCAC-3' o su complementaria es relevante para la unión de ω_2 .

Tabla 7. Unión de ω_2 al ADN consenso con una mutación.

Posición modificada	Posición de nucleótido ^a 1 2 3 4 5 6 7 1' 2' 3' 4' 5' 6' 7'	$[\omega_2]$ requerida para alcanzar la $K_{d,app}$ (en nM)
-	5'...a A T C A C a a A T C A C a...3'	~ 20
1	5'...C → → → → → ...3'	~ 10
1	5'...G → → → → → ...3'	~ 20
2	5'... T → → → → → ...3'	~ 20
2	5'... C → → → → → ...3'	> 160
2	5'... G → → → → → ...3'	~ 20
3	5'... A → → → → → ...3'	~ 80
3	5'... C → → → → → ...3'	~ 80
3	5'... G → → → → → ...3'	~ 160
4	5'... T → → → → → ...3'	~ 80
4	5'... A → → → → → ...3'	~ 160
4	5'... G → → → → → ...3'	> 160
5	5'... T → → → → → ...3'	> 160
5	5'... C → → → → → ...3'	~ 160
5	5'... G → → → → → ...3'	~ 160
6	5'... T → → → → → ...3'	> 160
6	5'... A → → → → → ...3'	> 160
6	5'... G → → → → → ...3'	> 160
7	5'... C → → → → → ...3'	~ 10
7	5'... G → → → → → ...3'	~ 20

^a Las secuencias están flanqueadas por tres adeninas en el extremo 5' y por tres citosinas en el 3' y por la zona de multiclonaje del vector. Se destaca la base que fue cambiada.

1.4. La proteína ω_2 interacciona con la región central 5'-WATCACW-3'

Para determinar con detalle no solo la región sino las bases que contacta la proteína, se realizaron ensayos de protección del ADN al ataque de agentes químicos (radical hidroxilo) con complejos ω_2 -ADN conteniendo tres ($\rightarrow_2\leftarrow$) y cuatro (\rightarrow_4) repeticiones. Estos sitios de unión muestran un patrón de protección diferente en ambas cadenas. La distribución de las posiciones protegidas en la cadena “superior” es diferente que la observada en la cadena “inferior”, sugiriendo que ω_2 interacciona de manera diferente con cada cadena. Como se ve en la Fig. 9A y 9B, las bases que son protegidas por la proteína ω_2 en el segmento de ADN conteniendo \rightarrow_4 se localizan en la secuencia 5'-AT-3' o 5'-ATC-3' (posiciones 2 y 3 o 2 a 4). Las bases protegidas en la primera repetición no pudieron ser cuantificadas por la baja resolución del gel en esa zona. Las regiones protegidas están separadas por 4 o 5 nucleótidos no protegidos (Figura 9B). En la cadena “inferior” los nucleótidos protegidos por ω_2 se encuentran en la secuencia 5'-GTG-3' (posiciones 4 a 6). Aquí las regiones protegidas quedan separadas por 4 nucleótidos no protegidos (Figura 9C).

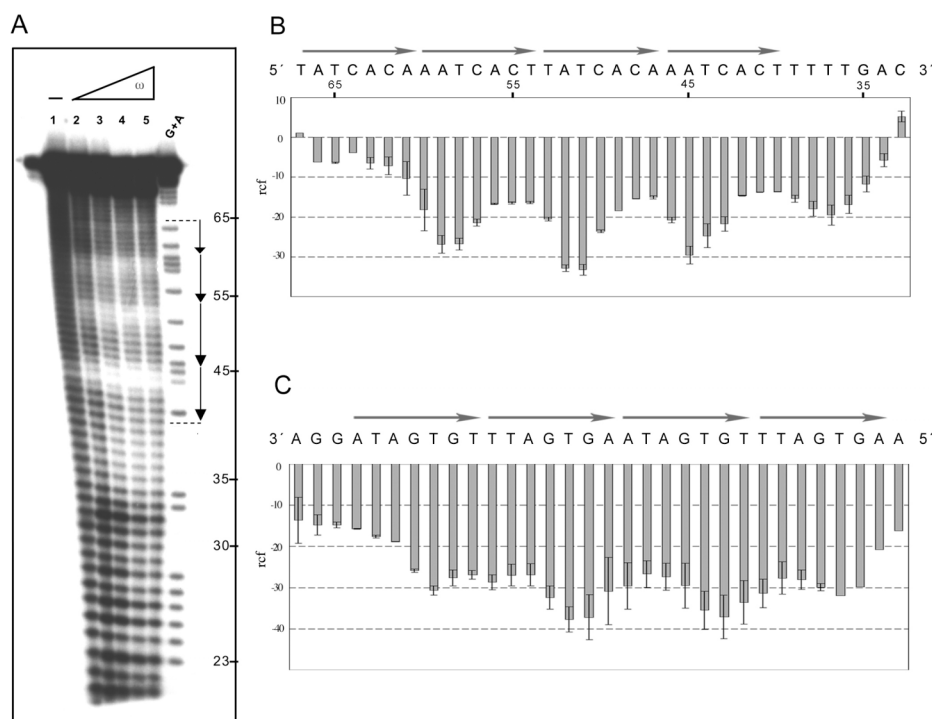


Figura 9. Ensayo de protección del ADN al ataque de agentes químicos (radical hidroxilo) utilizando ω_2 y ADN con cuatro repeticiones directas.

El fragmento de ADN [$\alpha^{32}\text{P}$]-*EcoRI*-*SphI* de 78-pb (cadena superior, A y B) o [$\alpha^{32}\text{P}$]-*HindIII*-*KpnI* de 73-pb (cadena inferior, C) (2 nM) fue incubado con concentraciones crecientes de ω_2 en tampón B durante 15 min a 37°C, seguido del tratamiento con radical hidroxilo. Las concentraciones de ω_2 son 8, 16, 32 y 64 nM (calles 2 a 5, respectivamente). Las bandas G+A fueron utilizadas como marcador de tamaño. En (B) y en (C) se indica la secuencia de \rightarrow_4 y el histograma de la protección de las cadenas de arriba y abajo respectivamente. Se calcula la frecuencia relativa de corte (ref, unidades arbitrarias) del ADN unido respecto al ADN libre. Las barras de error muestran la desviación estándar y representan valores promedio de tres experimentos independientes.

También se estudió la protección de un complejo ω_2 •ADN con ADN conteniendo tres ($\rightarrow_2\leftarrow$) repeticiones (Figura 10A a 10C). En la cadena “superior” las bases protegidas en las primeras dos repeticiones directas se encuentran en la secuencia 5'-AT-3' o 5'-ATC-3' y en la tercer repetición, que esta en orientación invertida, están protegidos los nucleótidos 5'-GTG-3' (Figura 10C). En la cadena “inferior” abajo, aparecen protegidos los nucleótidos 5'-GTG-3' de las repeticiones directas y la secuencia 5'-AT-3' o 5'-ATC-3' de la repetición invertida (Figura 10A y 10B).

Utilizando técnicas de espectrometría de Raman se llegó a la misma conclusión, los residuos 5'-AT-3' y 5'-GTG-3', estaban implicados en la interacción con la proteína ω_2 (Dostál y col., 2003)

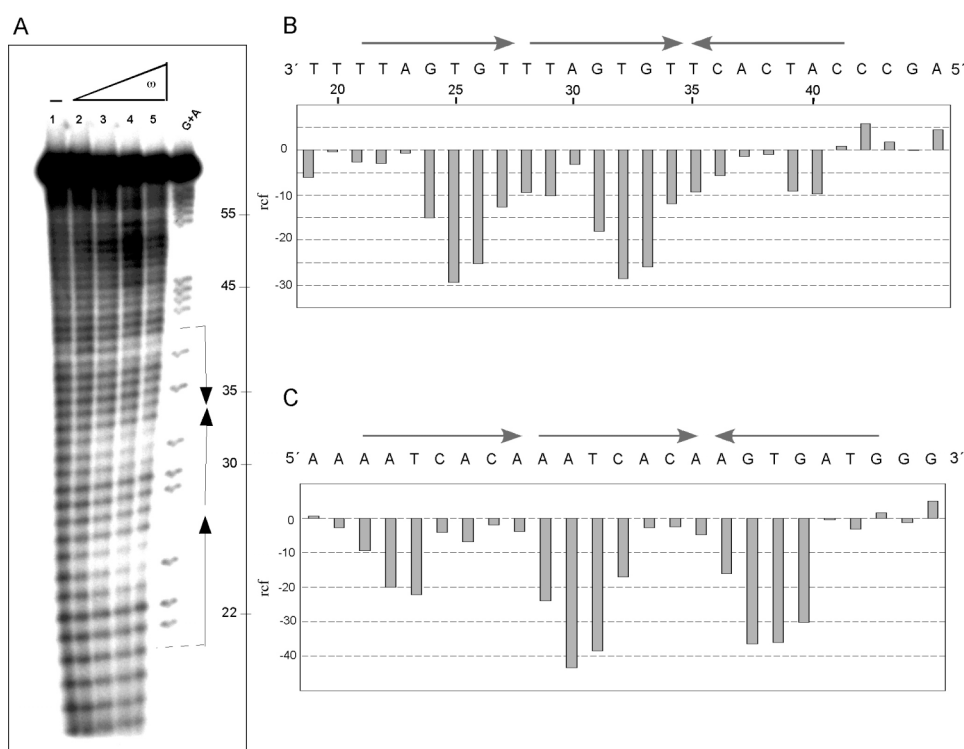


Figura 10. Ensayo de protección al ataque de radical hidroxilo de los complejos de ω_2 con ADN con tres repeticiones ($\rightarrow_2\leftarrow$).

El fragmento de ADN [$\alpha^{32}\text{P}$]- *Hind*III-*Kpn*I de 66-pb (cadena inferior, A y B) o [$\alpha^{32}\text{P}$]- *Eco*RI-*Sph*I de 71-pb (cadena superior, C) (2 nM) fue incubado con concentraciones crecientes de ω_2 en tampón B durante 15 min. a 37°C, seguido del tratamiento con radical hidroxilo. Las concentraciones de ω_2 son 8, 16, 32 y 64 nM (calles 2 a 5, respectivamente). Las bandas G+A fueron utilizadas como marcador de tamaño. En (B) y en (C) se indica la secuencia de $\rightarrow_2\leftarrow$ y el histograma de la protección al ataque del radical hidroxilo de las cadenas de arriba y abajo respectivamente. Se calcula la frecuencia relativa de corte (rcf, unidades arbitrarias) del ADN unido respecto al ADN libre.

1.5. La proteína ω_2 se une con menor afinidad a repeticiones 5'-^A/_TATCAC^A/_T-3' espaciadas entre sí

Los resultados anteriores muestran que: *i*) una mutación de una base en la zona central de una de las repeticiones en la configuración \rightarrow_2 reduce la unión de ω_2 en más de 8 veces comparado con el sitio consenso (Tabla 7) y *ii*) la proteína ω_2 protege específicamente el segmento 5'-ATCAC-3' de la repetición. Para determinar si la proteína se une a la secuencia consenso pero con separación entre las repeticiones, se ensayó la unión de ω_2 a un segmento de ADN conteniendo dos repeticiones separadas entre sí por 1-pb ($\rightarrow[1]\rightarrow$) a 4-pb ($\rightarrow[4]\rightarrow$). Se realizaron ensayos de protección al ataque de DNasa I y retraso en gel. En todos los casos la concentración de ω_2 requerida para formar complejo con el 50% del ADN, es de 100 a 120 nM, indicando una reducción de 5 a 6 veces en la afinidad por dos repeticiones separadas respecto a la afinidad por el sitio \rightarrow_2 ($K_{d,app} \sim 20$ nM) (Tabla 8).

Tabla 8. Unión de ω_2 a repeticiones espaciadas estudiado por experimentos de retraso en gel.

Repeticiones	$[\omega_2]$ requerida para alcanzar la $K_{d,app}$ (en nM)
5'.. \rightarrow \rightarrow .. 3'	20
5'.. \rightarrow [A] \rightarrow .. 3'	100
5'.. \rightarrow [AT] \rightarrow .. 3'	120
5'.. \rightarrow [ATA] \rightarrow .. 3'	100
5'.. \rightarrow [ATAG] \rightarrow .. 3'	150

2. Construcción y caracterización de variantes de ω_2

2.1. Aminoácidos relevantes en su interacción con ADN

Basados en la estructura de ω_2 en solución y de los cocristales con ADN de otras proteínas de la familia RHH, se pensó que además de los residuos Arg31 y Arg31', la Thr29 y Thr29' en las hojas β antiparalelas (Figura 11) podría tener un activo papel en la interacción con ADN. Previamente en el laboratorio se había construido, mediante mutagénesis dirigida, una variante de ω_2 en donde el codón 29 que codifica una Thr (Figura 11) fue reemplazado por un codón que codifica una Ala. Esta variante (ω_{T29A}) se clonó en el vector pET3a y se sobre-expresó en la cepa BL21(DE3) de *E. coli*. La proteína se purificó hasta homogeneidad según se juzgo por geles de SDS-PAGE. El protocolo de purificación utilizado fue prácticamente el mismo que se utiliza para purificar la proteína ω_2 silvestre sugiriendo que las regiones expuestas estaban conservadas.

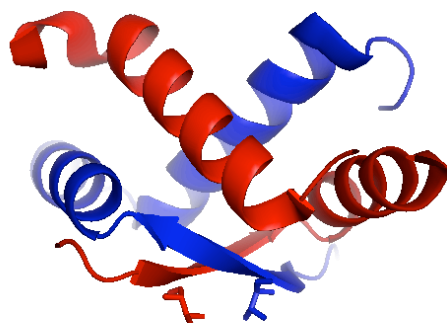


Figura 11. Localización del residuo Thr29 en la estructura de ω_2 .

Las cadenas laterales de la Thr29 se muestran como barras. La subunidad I y la subunidad II se muestran en rojo y azul respectivamente. La figura fue preparada con MacPymol utilizando las coordenadas atómicas de ω_2 (Murayama et al., 2001) depositadas en el PDB (*Protein Data Bank*) bajo el número 1IRQ.

La región N-terminal de la proteína ω_2 , está ausente en el cristal de ω_2 (Murayama y col., 2001), y se predice desordenada. Para determinar su papel se construyeron variantes de la proteína con deleciones secuenciales desde el N-terminal. Se diseñaron cebadores que anillaban desde el primer aminoácido que se deseaba como inicio de la proteína truncada, y hacia el 5' del cebador se introdujo la secuencia del sitio de unión al ribosoma y una diana para un enzima de restricción. Luego los diferentes fragmentos de PCR fueron introducidos en el vector pHP13 que ya llevaba el sitio promotor de ω_2 . Así, la secuencia codificante del gen ω sin los primeros 8, 18, 19 y 25 codones y el sitio de unión al ribosoma, fue fusionada a la región del P_ω y al codón de iniciación del gen ω silvestre (Figura 12). Del mismo modo que se hizo con las proteínas truncadas, se clonó el gen ω silvestre para tener un control positivo de que en este sistema las proteínas se expresaban correctamente.

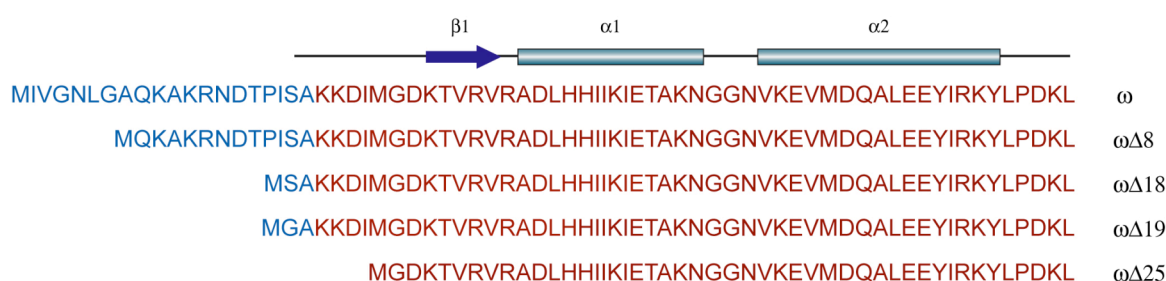


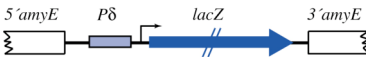
Figura 12. Comparación de las secuencias de las variantes de la proteína ω_2 .

El dibujo sobre las secuencias indica la estructura secundaria de las diferentes regiones. Se hicieron deleciones secuenciales desde el N-terminal. En rojo se indican los residuos que están presentes en la estructura resuelta.

2.2. Actividad *in vivo* de las variantes de la proteína ω_2

Los plásmidos derivados del pHP13 que expresan las variantes del gen ω y el gen ω silvestre, fueron transformados en una cepa de *B. subtilis* que lleva integrado en su genoma la región promotora del gen δ (P_δ) fusionada a una copia del gen *lacZ* sin promotor ($P_\delta::lacZ$). La transcripción del gen δ está regulado por ω_2 (de la Hoz y col., 2000), por lo que se midió posteriormente la actividad β -galactosidasa para determinar la capacidad de los productos de los genes introducidos de regular la transcripción a partir del promotor de δ . En trabajos previos, se había determinado que el producto del gen ω reducía la actividad de este promotor en aproximadamente 15 veces (de la Hoz y col., 2000). Se utilizó como control el plásmido que lleva la región SegB completa (Tabla 9, $\delta\omega\epsilon\zeta$). Como se resume en la Tabla 9, la utilización del P_δ se reduce en más de 10 veces cuando los genes ω , $\omega\Delta 8$, $\omega\Delta 18$ o $\omega\Delta 19$ se encuentran presentes. Sin embargo la presencia del gen $\omega\Delta 25$, que expresa una proteína sin los primeros 25 residuos, no es capaz de reprimir la utilización del P_δ . El producto del gen $\omega T29A$, que presumimos incapaz de unir ADN específicamente, no inhibe la expresión del gen *lacZ*.

Tabla 9. Expresión *in vivo* del promotor de δ (P_δ) fusionado a *lacZ* en presencia de las variantes de ω



Genes provistos <i>in trans</i>	Actividad β -Galactosidasa*
	Utilización de P_δ
Ninguno	2260
Vector	1918
$\delta\omega\epsilon\zeta$	55
ω	85
$\omega\Delta 8$	261
$\omega\Delta 18$	202
$\omega\Delta 19$	167
$\omega\Delta 25$	2277
$\omega T29A$	1979

*Actividad de P_δ en la presencia o ausencia de los productos indicados. La actividad β -Galactosidasa está expresada en Unidades Miller. En la figura superior se muestra la organización en el cromosoma de *B. subtilis* de la fusión.

2.3. Análisis *in vitro* de las variantes de la proteína ω_2

Los resultados *in vivo* indican que la ausencia de los primeros 19 residuos no afectan a la función de represor transcripcional de la proteína ω_2 . En cambio el residuo Thr29 presente en la hoja β antiparalela, parece tener un papel relevante en la función de la proteína ω_2 , al igual que los residuos que van desde la posición 19 a la 25. Para intentar determinar el mecanismo por el cuál estas dos variantes no reprimen la utilización del promotor *in vivo*, se realizaron ensayos bioquímicos con el objeto de caracterizarlas y compararlas con la proteína silvestre.

Por medio de PCR, se amplificaron los fragmentos de ADN conteniendo la secuencia de las proteína truncadas y fueron clonados en el vector pT712 para su sobre-expresión en *E. coli* BL21(DE3). Las deleciones fueron confirmadas por secuenciación de los clones y sus productos sobre-expresados: las proteínas $\omega\Delta 8$, $\omega\Delta 19$ y $\omega\Delta 25$ fueron purificadas como se describe en Materiales y Métodos hasta homogeneidad según se juzgó por geles de SDS-PAGE.

2.3.1. Estado oligomérico de las proteínas mutadas

La proteína ω silvestre es un dímero en solución y cristalizó como tal (Misselwitz y col., 2001; Murayama y col., 2001) aún en ausencia de los primeros 20 residuos como se comenta en la introducción, por lo tanto, se esperaba que las variantes $\omega\Delta 8$, $\omega\Delta 19$ y $\omega\Delta 25$ formaran dímeros en solución. Las proteínas purificadas fueron tratadas con ácido subérico, un agente químico que introduce enlaces covalentes entre aminas primarias que se encuentren a una distancia menor de 11,4 Å. La mezcla de las reacciones fue separada por geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Figura 13). En la Figura 13B se muestra el resultado para la variante ω_2 T29A. Se observan monómeros y dímeros a bajas concentraciones de DSS, a mayores concentraciones, la banda correspondiente al peso molecular de un dímero es el producto principal de la reacción (Figura 13B calles 5-8), mientras que a muy altas concentraciones de agente químico, se observan bandas correspondientes a un tetrámero, en mayor proporción para la proteína silvestre.

Como se esperaba por los datos de los ensayos *in vivo* y la estructura de ω_2 , las variantes $\omega\Delta 8$, $\omega\Delta 19$ y $\omega\Delta 25$ también forman dímeros en solución (no mostrado).

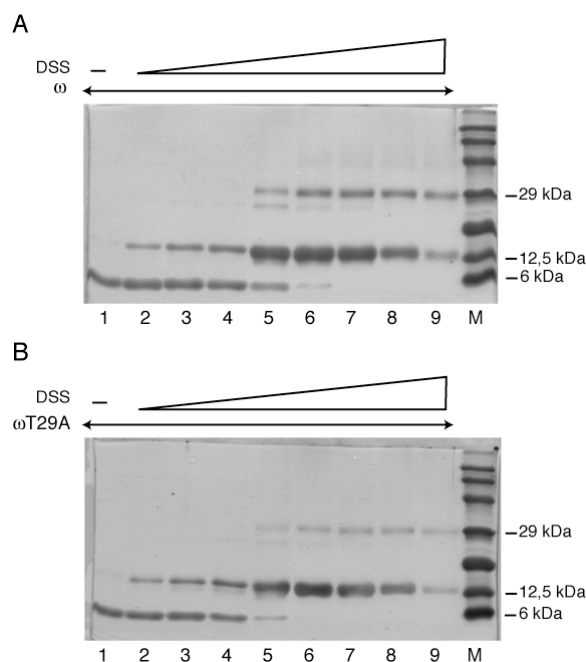


Figura 13. Oligomerización de las proteína ω_2 y ω_2T29A

Ambas proteínas, ω_2 (en A) y ω_2T29A (en B) (75 μ M) fueron incubadas con concentraciones crecientes de Acido Subérico (DSS) durante 10 minutos a 37°C en tampón B, y luego los productos de la reacción de entrecruzamiento fueron resueltos en un gel desnaturalizante de poliacrilamida del 15%. Las concentraciones de DSS son de 0, 20, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 and 1500 mM en las calles 1 a 9. M indica el marcador de peso molecular de proteínas.

2.3.2. Unión a ADN

Una de las características más relevantes de ω_2 , es la unión al ADN consenso con alta afinidad y especificidad, y la cooperatividad que presenta esta unión. Nos preguntamos como sería la unión al sitio consenso de las variantes de ω_2 .

Se determinó tanto por ensayos de protección al ataque de DNAsa I como por ensayos de retraso en gel (Figura 14) la afinidad de las distintas variantes por el ADN.

La afinidad de las proteínas que tienen una delección en el amino terminal es aproximadamente dos veces menor comparada con la proteína silvestre. Estas variantes forman el mismo tipo de complejo que la silvestre, y también muestran cooperatividad en la unión (Figura 14). En cambio la proteína ω_2T29A es incapaz de formar complejos en el rango de concentraciones utilizados. Cuando ω_2T29A está presente en exceso de 60 veces respecto a la concentración de ω_2 requerida para formar un complejo con el ADN, se forma un complejo que es retenido en el pocillo (Figura 14C). La proteína puede estar formando un agregado proteína-ADN o interaccionar de manera inespecífica con el ADN, probablemente con el esqueleto de fosfatos.

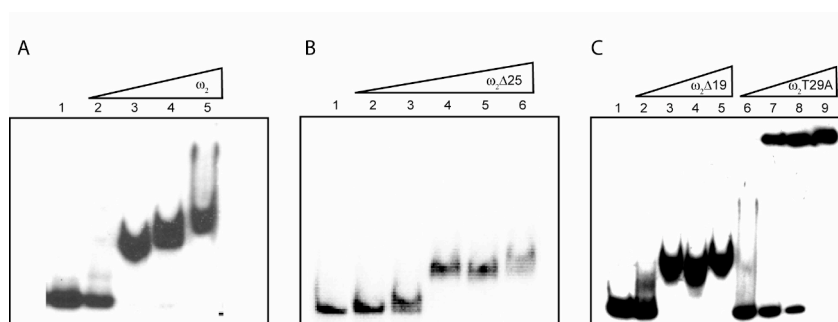


Figura 14. Interacción de las variantes de ω_2 con el ADN

Interacción de las proteínas ω_2 , $\omega_2\Delta19$, $\omega_2\Delta25$ y ω_2T29A con ADN conteniendo la secuencia promotora del gen *CopS*. El fragmento de ADN [$\alpha^{32}P$]-*HindIII-KpnI* de 300 pb (0,2 nM) se incubó durante 15 min a 37°C en tampón B con concentraciones crecientes de las proteínas ensayadas. Los complejos ω_2 •ADN fueron analizados por retraso en gel. Las concentraciones de proteínas son: 5 nM, 10 nM, 20 nM y 40 nM para ω_2 (calles 2 a 5) (A), 5 nM, 10 nM, 20 nM, 40 nM y 80 nM para $\omega_2\Delta25$ (calles 2 a 6) (B) 10 nM, 20 nM, 40 nM y 80 nM para $\omega_2\Delta19$ (C) y 1 μ M, 2 μ M, 4,5 μ M y 9 μ M para ω_2T29A (calles 6 a 9) (C). En todos los casos en la calle 1 no hay proteína.

En la Tabla 10 se resumen las constantes aparentes de disociación obtenidas por los distintos métodos.

Tabla 10. Concentración de las variantes de ω_2 requerida para unir el 50% del ADN consenso ($k_{d,app}$ en nM)

Proteína	EMSA	DNasa I
ω_2	~10	~8
$\omega_2\Delta19$	~20	~20
$\omega_2\Delta25$	~20	~30
ω_2T29A	> 500	> 500

La variante $\omega_2\Delta25$ se comporta *in vitro* como la proteína silvestre, sin embargo, es incapaz de reprimir la utilización del P_δ *in vivo*.

Para caracterizar mejor la posible unión de ω_2T29A al ADN, se realizó un ensayo de protección a DNasa I con complejos formados por $\omega_2\Delta19$ y ω_2T29A con el mismo fragmento de ADN utilizado en la Figura 14. $\omega_2\Delta19$ protege una región de 80 pb igual que ω_2 (de la Hoz y col., 2000), pero ω_2T29A , aun en un exceso de 250 veces, no protege este fragmento de ADN del ataque de DNasa I (Figura 15). Esto indica que, de acuerdo a lo esperado, los agregados que no entraban en el gel nativo estaban formados por interacciones inespecíficas de ω_2T29A con el ADN a altas concentraciones.

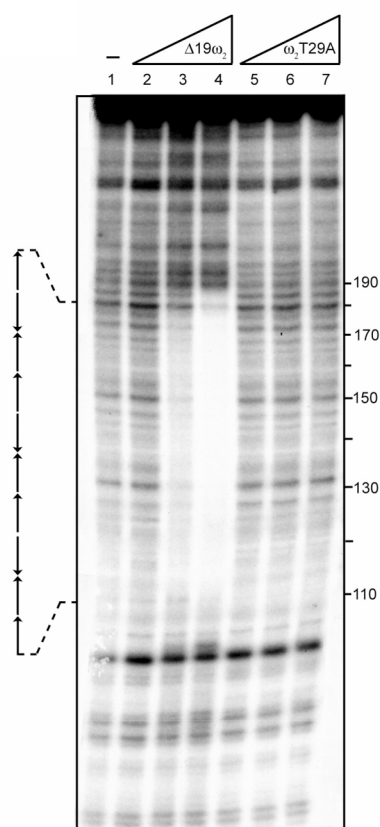


Figura 15. Ensayo de protección a la digestión por DNasa I con las variantes de ω_2 .

Ensayo de protección a la digestión por DNasa I de las proteínas $\omega_2\Delta 19$ y ω_2T29A con ADN conteniendo la secuencia promotora del gen *CopS*. El fragmento *HindIII-KpnI* de [$\alpha^{32}P$]- ADN de 300 pb (2 nM), se incubó durante 15 min. a 37°C en tampón B con concentraciones crecientes de las proteínas ensayadas, seguido de digestión limitada con DNasa I. Las concentraciones son: 7, 15 y 30 nM para $\omega_2\Delta 19$ (calles 2 a 4) y 1, 2 y 4 μ M para ω_2T29A (calles 5 a 7). El símbolo – indica ausencia de proteína. Las flechas de la izquierda indican las repeticiones.

2.3.3. Conformación y estabilidad térmica de la proteína ω_2 y sus variantes

En colaboración con el Dr. Heinz Welfle, se estudio la conformación de las variantes de la proteína ω_2 utilizando dicroísmo circular (DC). El espectro obtenido para la proteína silvestre, $\omega_2\Delta 8$, $\omega_2\Delta 19$ y ω_2T29A es muy similar (Figura 16) (Welfle y col., 2005) y en todos los casos indica que la α -hélice es el componente mayoritario de su estructura secundaria. Este dato está confirmado por la estructura resuelta, para la proteína ω_2 silvestre (Murayama y col., 2001).

La proteína ω_2 silvestre y la variante ω_2T29A , presentan un espectro casi idéntico, indicando que tienen conformaciones similares (Figura 16). El contenido en elementos de estructura secundaria, se calcula a partir de estos espectros y confirman los resultados anteriores obtenidos para ω_2 silvestre (42% hélices α , 13% hojas β y 19% de giros) (Misselwitz y col., 2001), y resulta en contenidos similares para ω_2T29A (42% hélices α , 9 % hojas β y 23% de giros). La treonina 29 resulta un residuo indispensable para la unión

específica de ω_2 al ADN, y el cambio en este aminoácido elimina la unión sin cambiar la conformación de la proteína.

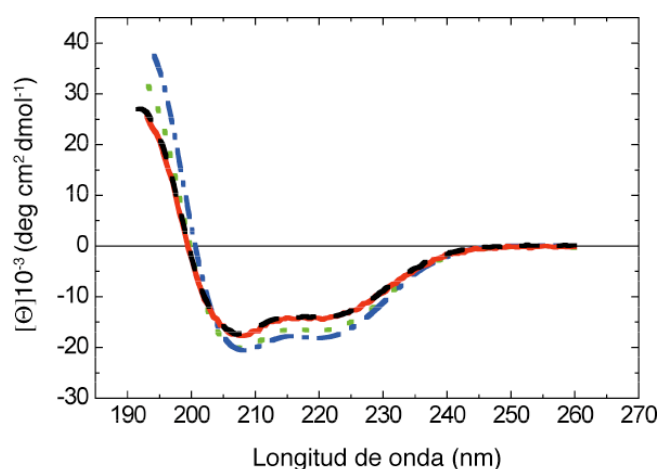


Figura 16. Espectro de Dicroísmo Circular de las variantes de ω_2 .

Espectro obtenido para ω_2 (46,3 μ M; línea roja sólida), ω_2 T29A (45,2 μ M, línea de discontinua negra), ω_2 Δ8 (69,1 μ M, línea de puntos verdes) y ω_2 Δ18 (41,4 μ M, línea discontinua azul) en tampón B.

El espectro obtenido con las variantes ω_2 Δ8 y ω_2 Δ19 muestran pequeños cambios en la elipticidad que son consistentes con la noción de que el N-terminal que se omite está desordenado en la proteína ω_2 silvestre, y no se observan cambios en la estructura central (Welfle y col., 2005). Estos resultados, introducen la pregunta para qué una proteína tan pequeña, tiene un extremo N-terminal innecesario para las actividades hasta ahora ensayadas.

3. Determinación de la estructura de ω_2 en complejo con repeticiones en forma directa e inversa

Mientras se llevaba a cabo este trabajo, en colaboración con el grupo del Dr. Wolfram Saenger se consiguió la co-estructura de la proteína ω_2 Δ19 con ADN. La resolución de esta estructura nos ha permitido confirmar datos obtenidos bioquímicamente y comprender mejor la forma de unión de la proteína ω_2 a la secuencia consenso. A continuación se describen los puntos más importantes que resultan de esta colaboración.

Los intentos de cristalizar la proteína ω_2 silvestre en complejo con el ADN no fueron exitosos y solo se obtuvieron cristales que no difractaban. Se utilizó entonces la variante ω_2 Δ19 que, como se demostró previamente, se une específicamente y con solo 2 veces menos de afinidad a las secuencias consenso. Se obtuvieron dos cocristales de ω_2 Δ19 unida a dos

operadores mínimos conteniendo repeticiones directas ($\rightarrow\rightarrow$) e inversas ($\rightarrow\leftarrow$) que fueron determinados con una resolución de 2,45 Å y 2,6 Å, respectivamente (Figura 17) y un tercer cristal con una variante mutante en la secuencia de ADN. Se intentó, sin éxito, conseguir el cocrystal con las repeticiones en organización divergente ($\rightarrow\leftarrow$).

Sin ser intencional, en ambos casos, en la misma unidad asimétrica cristalizó también ADN libre, lo cual nos permitió comparar cambios estructurales en el ADN inducidos por la unión del represor (Figura 17).

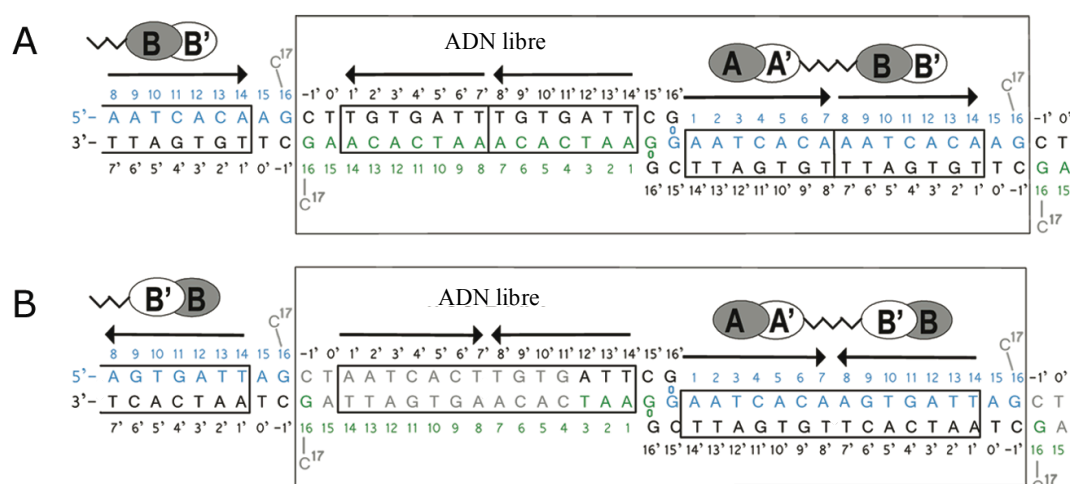


Figura 17. Esquema del ADN utilizado para la cocrystalización y organización de los complejos en el cristal.

Las cajas grandes muestran el ADN en complejo y libre que se describe. Las subunidades que interactúan de manera similar están marcadas como óvalos grises o blancos. Las líneas en zig-zag indican la interacción entre las subunidades a través de las hélices α1. Las repeticiones están indicadas por flechas negras. En (B) los nucleótidos en gris en la zona de ADN libre, no pudieron ser modelados debido a la pobre densidad electrónica.

3.1. Interacciones ADN-proteína

La descripción de la estructura se centra en las interacciones entre el dímero ωΔ19B/B' y la segunda repetición en la organización ($\rightarrow\rightarrow$) (repetición A8-A14 (Figura 17 y 18) ya que es la zona mejor definida en el cristal (Weihofen y col., 2006).

En los surcos mayores del ADN, se forman interacciones específicas con la Thr29 y la Arg31 localizadas en la hoja β. Las treoninas de ambos monómeros, hacen contactos específicos con las bases centrales G4'-C11, y la Arg31 de la subunidad ωΔ19B, contacta mediante un puente de hidrógeno con la base G2'. En contraste, la Arg31' correspondiente del monómero ωΔ19B' contacta con la Thr29 y con las bases G4', A5' y A9 indirectamente (Figura 18).

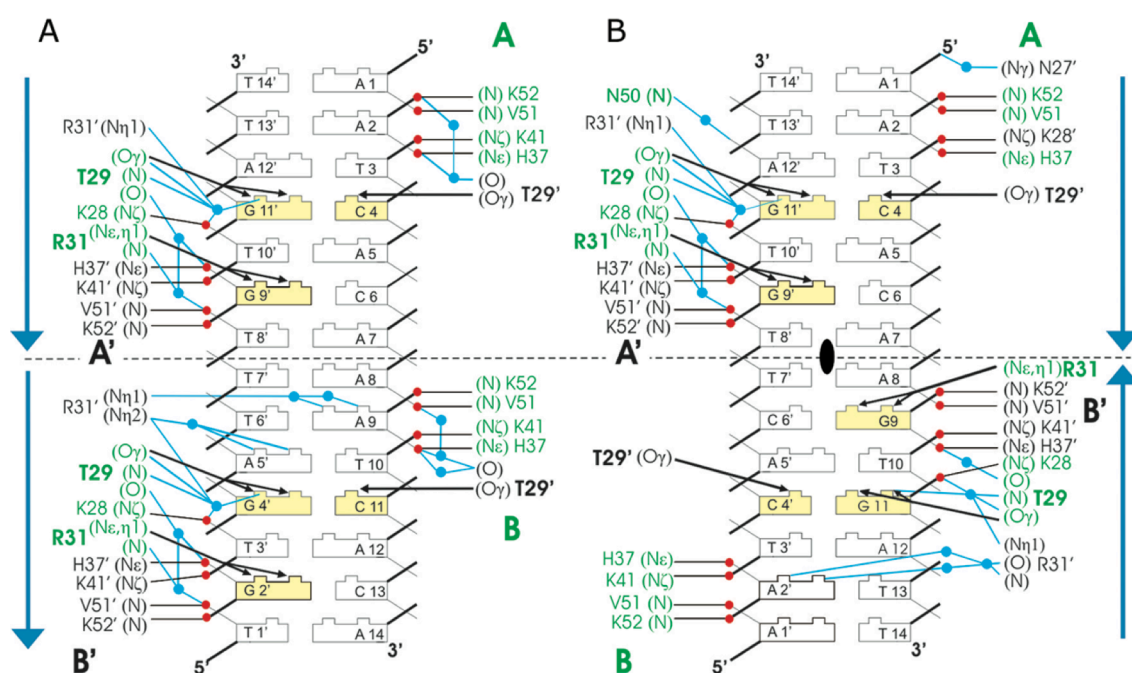


Figura 18. Esquema de las interacciones ADN- $\omega_2\Delta 19$.

Interacciones en $[\omega_2\Delta 19]_2$ $(\rightarrow\rightarrow)$ (izquierda) y en $[\omega_2\Delta 19]_2$ $(\leftarrow\leftarrow)$ (derecha). La orientación de las repeticiones esta marcada con flechas azules. Las bases marcadas en amarillo interactúan específicamente con $\omega_2\Delta 19$. Los residuos están marcados en verde para $\omega\Delta 19A/B$ y en negro para $\omega\Delta 19A'/B'$. Los puntos rojos son los oxígenos de los fosfatos, los puentes de hidrógeno con estos oxígenos están indicados por líneas negras delgadas, los puentes de hidrógeno específicos con las bases del surco mayor, se marcan con flechas negras. Las líneas azules delgadas indican puentes de hidrógeno mediados por moléculas de agua (punto azules).

Para comprobar si $\omega_2\Delta 19$ se uniría de manera simétrica a una secuencia palindrómica donde hubiera dos guaninas a las que pudieran unirse ambas Arg31 y Arg31', se diseño una secuencia de ADN conteniendo dos repeticiones directas pero con una mutación donde la base A9-T6' de la segunda repetición se cambio por una G9-C6' (secuencia: $^8\text{AGTCACA}^{14}$). Se resolvió la estructura de la proteína $\omega_2\Delta 19$ en complejo con esta secuencia palindrómica y se observo que el patrón de interacción no cambiaba. Esta observación concuerda con las dos veces que disminuye la afinidad, en ensayos de protección a DNasa I, de ω_2 por dos repeticiones directas con la misma mutación en el primer heptámero (ver Tabla 7).

Las interacciones específicas de $\omega_2\Delta 19$ con las bases, presentan un patrón asimétrico que se mantiene en cualquier orientación de las repeticiones.

El esqueleto de fosfatos, en todos los casos, contacta con las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de las subunidades de $\omega\Delta 19$ de manera simétrica. En la subunidad $\omega\Delta 19B$ (Figura 18) el fosfato 5' de la base A9 contacta mediante puentes de hidrógeno con los residuos Val51 y Lys52, un modo de interacción utilizado por otras proteínas de la familia RHH (Weihofen y col., 2006).

La His37 y la Lys41 de la hélice $\alpha 1$ contacta con el fosfato 5' de T10. Los residuos correspondientes en la subunidad $\omega\Delta 19B'$ interaccionan de manera similar y simétricamente con las bases G2' y T3'. Sin embargo hay un contacto asimétrico que contribuye a las interacciones. La Lys28 presente en la hoja β de la subunidad $\omega\Delta 19B$, forma un puente salino con el fosfato 5' de la base G4' mientras que el residuo correspondiente en la subunidad $\omega\Delta 19B'$ se encuentra a más de 5 Å del correspondiente fosfato de la base C11 (Figura 18).

Este patrón de interacción (5'-AT-3' en la cadena superior y 5'-GTG-3' en la inferior), es precisamente, el descrito por métodos bioquímicos (Figuras 9 y 10).

3.2. Comparación de $[\omega_2\Delta 19]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ y $[\omega_2\Delta 19]_2-(\rightarrow\leftarrow)$

El eje de simetría que relaciona los monómeros en cada $\omega_2\Delta 19$ pasa a través de las bases centrales GC de cada repetición (Figura 19B). En consecuencia, estos ejes están separados por 7 pb en $[\omega_2\Delta 19]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ pero están 0,6 Å más cerca en $[\omega_2\Delta 19]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ (Figura 19B, líneas de puntos rojas y verdes respectivamente).

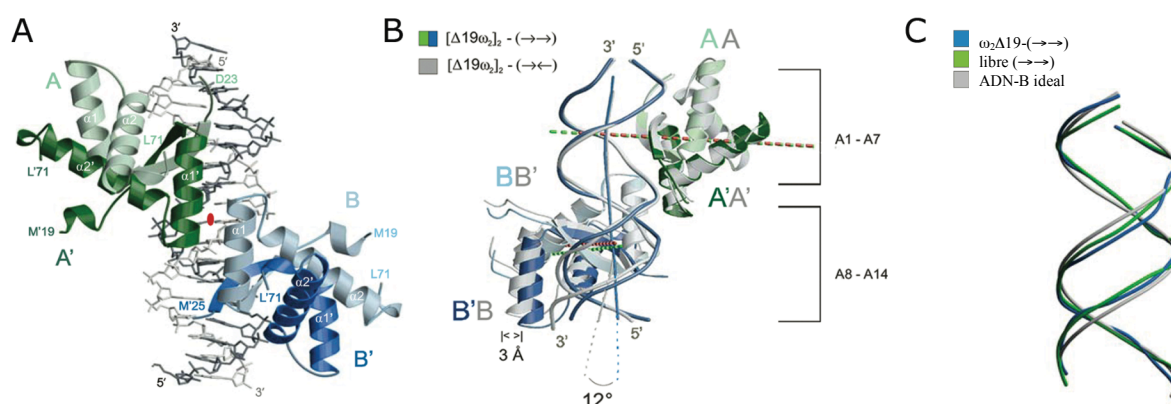


Figura 19. Estructura de $[\omega_2\Delta 19]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ y en $[\omega_2\Delta 19]_2-(\rightarrow\leftarrow)$

(A) El ADN se muestra en gris claro para la cadena superior y gris oscuro para la cadena inferior. Los monómeros A/A' y B/B' se marcan en verde claro y oscuro y azul claro y oscuro, respectivamente. Se indican las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ en letras blancas. El óvalo rojo indica el eje perpendicular al papel que relaciona las hélices $\alpha 1'$ de A' y la hélice $\alpha 1$ de B. (B) Superposición de $\omega\Delta 19A/A'$ de $[\omega_2\Delta 19]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ (verde) y $\omega\Delta 19A/A'$ de $[\omega_2\Delta 19]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ (gris) para mostrar las leves diferencias en la posición de $\omega\Delta 19B/B'$ asociadas con la secuencia palindrómica ($\rightarrow\leftarrow$). Los ejes de simetría que relacionan los monómeros en $\omega_2\Delta 19$ están indicados como líneas discontinuas roja para $[\omega_2\Delta 19]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ y verde para $[\omega_2\Delta 19]_2-(\rightarrow\rightarrow)$. Las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 1'$ involucradas en la interacción $\omega_2\Delta 19\dots\omega_2\Delta 19$, se superponen bien, permitiendo la unión cooperativa en ambos complejos. El ADN en $[\omega_2\Delta 19]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ presenta una pequeña curva de 12° en el centro (G11-C4') de la segunda repetición y los $\omega_2\Delta 19$ de $[\omega_2\Delta 19]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ (gris) está 0,6 Å (distancia vertical entre los ejes) más cerca que en $[\omega_2\Delta 19]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ (verde y azul). (C) ADN libre (verde) y en complejo con $(\rightarrow\rightarrow)$ en azul, superpuestos con el ADN B ideal (gris).

Las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 1'$ que forman la interfaz dímero-dímero se superponen perfectamente en ambos complejos, siendo esto coherente con el hecho de que la constante aparente de disociación calculada previamente sea prácticamente la misma para ambas orientaciones (Tabla 6).

En contraste, la separación entre dos $\omega_2\Delta 19$ unidos a dos repeticiones divergentes ($[\omega_2\Delta 19]_2 - (\leftarrow \rightarrow)$) sería de 0,6 Å mas grande que en el caso del complejo $[\omega_2\Delta 19]_2 - (\rightarrow \rightarrow)$. Asumiendo que el patrón de interacción fuera el mismo, la distancia entre las hélices $\alpha 1$ sería más grande, siendo esto desfavorable para la unión cooperativa de ω_2 al ADN. Estos resultados son consistentes con datos bioquímicos, ya que se necesita 6 veces mas ω_2 para formar el mismo tipo de complejo (Tabla 6).

3.3. Conformación del ADN libre y unido a $\omega_2\Delta 19$

Otras proteínas pertenecientes a la familia de las RHH, como CopG o Arc, introducen una gran curvatura en el ADN al unirse a él (Gomis-Ruth y col., 1998; Raumann y col., 1994). En el caso de ω_2 no se observaba este efecto. En los ensayos de protección a DNasa I, no se ven zonas de hipersensibilidad marcada (Figura 8), y por microscopía electrónica, no se ven cambios importantes en la región del ADN a la que se une ω_2 (de la Hoz y col., 2000). Por eso resultó interesante poder analizar en el mismo cristal el ADN libre y el ADN en complejo con ω_2 . El ADN en los cristales es ADN en forma B, casi recto, con ciertas desviaciones del ADN-B ideal. Se observa un ligero ensanchamiento de los surcos mayores y el surco menor se comprime de manera diferente de acuerdo a la secuencia en el ADN con dos repeticiones directas ($\rightarrow \rightarrow$) o el que contiene dos repeticiones inversas ($\rightarrow \leftarrow$). El ADN libre en el cristal de $[\omega_2\Delta 19]_2 - (\rightarrow \rightarrow)$, pudo ser modelado, y muestra características similares a las de ADN en complejo con $\omega_2\Delta 19$ (Figura 19C). Puede deducirse de esta observación que las desviaciones del ADN-B ideal, son consecuencia de la secuencia de nucleótidos y no inducidas por la unión de $\omega_2\Delta 19$ (Weihofen y col., 2006).

3.4. Interacciones dímero-dímero

La zona de interacción entre dímeros se encuentra entre las hélices $\alpha 1$ de monómeros adyacentes A' y B en $[\omega_2\Delta 19]_2 - (\rightarrow \rightarrow)$ y A' y B' en $[\omega_2\Delta 19]_2 - (\rightarrow \leftarrow)$ (Figura 17, 19 y 20B).

En detalle, la interacción entre dímeros está dada por puentes de hidrógeno entre los residuos His38 (y His38') y Ala45' y Lys46' (Ala45 y Lys46) (Figura 20)

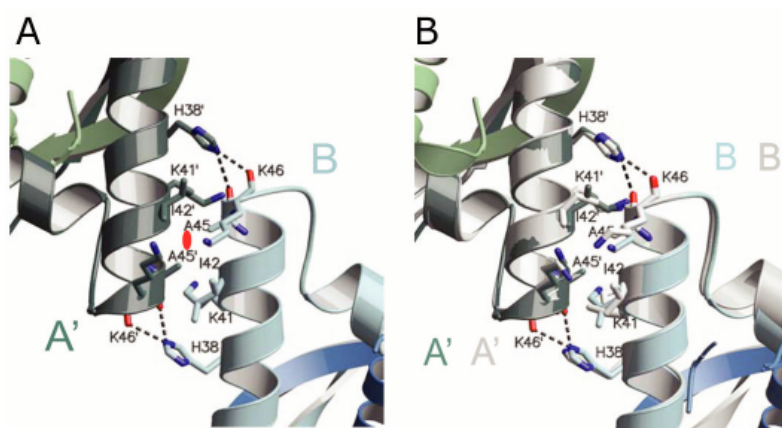


Figura 20. Interacciones dímero-dímero

(A) El óvalo rojo marca el eje perpendicular al plano del papel. Se marcan las cadenas laterales de los residuos que contactan a menos de 4 Å con la otra hélice. Los puentes de hidrógeno bifurcados que unen los residuos His38 (His38') con los aminoácidos Lys46 y Ala45 (Lys46' y Ala45') de la otra subunidad están marcados con líneas de puntos. (B) Superposición de las subunidades como en la figura 19 donde se observa que las interacciones entre los dímeros en $[\omega_2\Delta 19]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ y en $[\omega_2\Delta 19]_2-(\rightarrow\leftarrow)$, son comparables.

En la figura 20B, se superponen las estructuras $[\omega_2\Delta 19]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ y $[\omega_2\Delta 19]_2-(\rightarrow\leftarrow)$, y se observa que las interacciones dímero-dímero son comparables en ambas. Las His38 son idénticas en ambos complejos, mientras que la cadena hidrofóbica de la Ile42 cambia de conformación sin afectar la interacción.

Estas interacciones aseguran la unión cooperativa cuando varios ω_2 se asocian con las series de repeticiones que se encuentran en los operadores del plásmido.


3.4.1. Construcción de un mutante en el residuo His38

Para comprobar la importancia del aminoácido His38 en la formación de los complejos nucleoproteicos de ω_2 con el sitio consenso, se decidió construir una variante de ω_2 con un cambio en el codón 38 de una valina en lugar de la histidina. De esta manera se elimina la posibilidad de formar puentes de hidrógeno.

Por mutagénesis dirigida, se construyó el mutante $\omega H38V$. Este gen fue clonado en el mismo sistema en el que se encuentra el gen ω silvestre y se ensayó *in vivo* la capacidad de represión. El plásmido resultante fue transformado en la cepa BG508 que previamente se había utilizado para definir la capacidad de reprimir la utilización del promotor de δ de las diferentes variantes de ω_2 construidas (Tabla 9).

El producto del gen $\omega H38V$, reprime la utilización de P_δ *in vivo* con 5 veces menor eficiencia que ω_2 silvestre, sugiriendo la importancia que tiene el residuo His38 para la unión cooperativa de ω_2 al ADN, y la importancia de esa interacción cooperativa para su función como represor transcripcional (Tabla 11)

Tabla 11. Expresión *in vivo* del promotor de δ (P_δ) fusionado a *lacZ* en presencia de las variantes de ω



Genes provistos <i>in trans</i>	Actividad β -Galactosidasa*
	Utilización de P_δ
Ninguno	1979
Vector	2016
$\delta\omega\epsilon\zeta$	32
ω	71
$\omega\Delta 19$	104
$\omega H38V$	467

*Actividad de P_δ en la presencia o ausencia de los productos indicados. La actividad β -Galactosidasa está expresada en Unidades Miller.

En la figura superior se muestra la organización en el cromosoma de *B. subtilis* de la fusión.

4. Sistema de partición activa

4.1. Alineamiento de secuencias

La proteína δ_2 se encuentra codificada en la región SegB del plásmido pSM19035. Se había descrito como parte de la superfamilia de ATPasas involucradas en partición activa de plásmidos. Esta familia presenta un dominio de Walker desviado del consenso (Koonin, 1993; Motallebi-Veshareh y col., 1990). Este fue el primer indicio que nos llevó a considerar a esta proteína parte de un sistema de partición activa. Dentro de esta familia, como se comentó en la introducción, se pueden dividir subgrupos basados en la longitud de la proteína, y la presencia o no de un dominio definido de unión a ADN. La proteína δ presenta mayor homología con las proteínas enmarcadas en el grupo Ib (Tabla 1) mostrando una identidad de 18 y 21,5 % respectivamente con MinD y con Soj (Figura 21). En el alineamiento se subrayan los dominios de Walker conservados para esta familia.

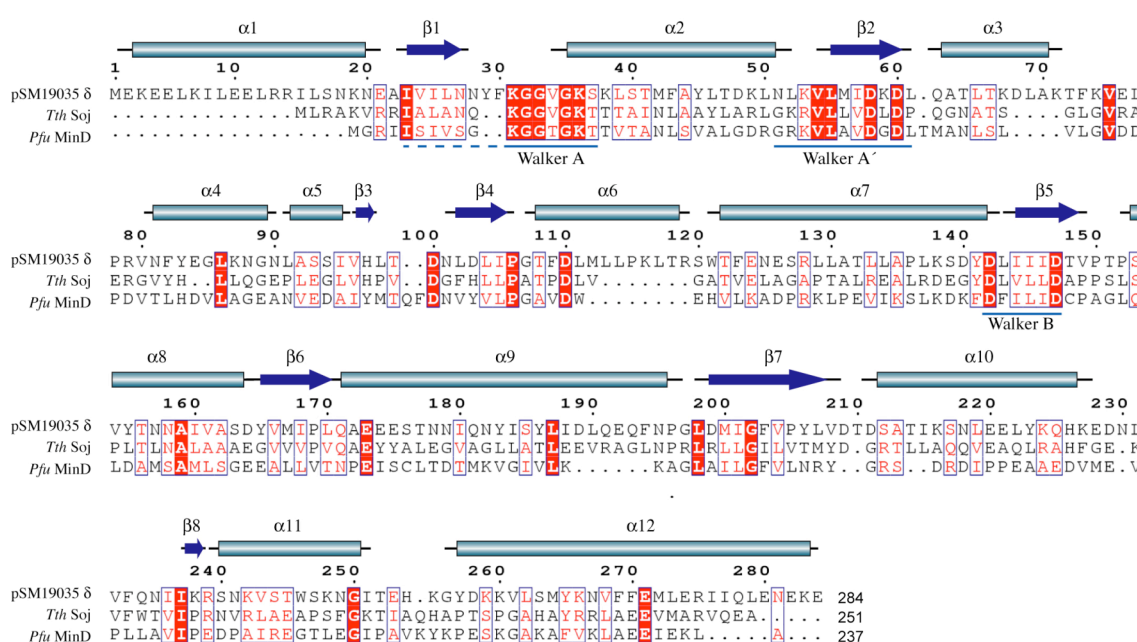


Figura 21. Alineamiento de secuencias y estructura secundaria de proteínas de la familia ParA/MinD

Los motivos de Walker A, A' y B se encuentran subrayados. Se marcan con cilindros las hélices α y con flechas las hojas β de la estructura de la proteína δ_2 (ver apartado 5 de este capítulo). Los residuos idénticos se muestran con letras blancas y fondo rojo, los residuos conservados están recuadrados en azul y en letra rojas. *Pfu*, *Pyrococcus furiosus*, *Tth*, *Termus thermophilus*. El alineamiento fue hecho con el servidor T-Coffee (<http://igs-server.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi>) y las identidades varían de 14 a 25%

La secuencia consenso del motivo de Walker (GxxGxGK[ST]) se desvía hacia KGGxxK[ST] y se observa un motivo adicional al Walker A y B, que se denomina Walker A' y es característico de la familia. Se puede observar que la proteína δ de pSM19035, tiene una extensión hacia el N-terminal del que carecen las otras dos.

Según los sistemas de predicción de estructura secundaria se necesitaría un 25% de identidad en una región de más de 80 aminoácidos para poder predecir que la proteína δ tuviese una estructura similar a MinD y Soj (Sander y Schneider, 1991).

Se decidió purificar la proteína δ silvestre y basándonos en la secuencia y en datos publicados para MinD y Soj, se decidió construir y purificar una proteína mutada que *a priori* fuese incapaz de unir e hidrolizar ATP, además de la proteína δ silvestre. Se decidió cambiar la Lys36 del motivo Walker A por una Ala.

4.2. Análisis *in vitro*

4.2.1. Clonación, purificación y determinación de su estado en solución

La secuencia que codifica la proteína δ fue obtenida por PCR del plásmido pBT291 y clonada en un vector de expresión de *E. coli*. Por medio de mutagénesis dirigida (descrito en Materiales y Métodos) se obtuvo el mutante puntual δ K36A. Ambas proteínas fueron sobre-expresadas en *E. coli* BL21(DE3) y purificadas hasta homogeneidad según se observa por SDS-PAGE.

Se ha descrito que MinD y Soj, proteínas homólogas de δ , forman dímeros solo en presencia de ATP (Cordell y Lowe, 2001; Leonard y col., 2005). Con las proteínas purificadas, δ y δ K36A, se determinó cual era su estado oligomérico en solución. Se ensayó la formación de oligómeros en presencia de ATP, ADP y en ausencia de nucleótido. Se incubaron las proteínas con el agente químico ácido súberico y la mezcla fue resuelta en un gel de SDS-PAGE (Figura 22).

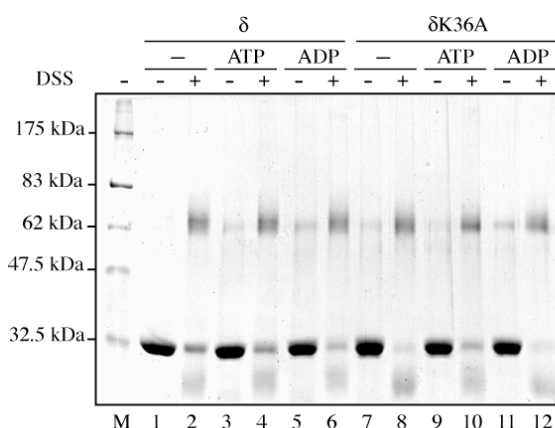


Figura 22. Dimerización de las proteínas δ_2 y δ_2 K36A.

Las proteínas δ_2 o δ_2 K36A fueron incubadas durante 15 minutos a 37°C en tampón B, se añadió ácido súberico (DSS) (0,5 mM) y la reacción fue incubada durante otros 5 minutos. Las muestras se resolvieron en un gel de SDS-PAGE del 10%. Ambas proteínas forman dímeros de manera independiente de nucleótido.

La masa teórica de las proteínas δ y δ K36A es de 34,4 kDa, en el gel se puede ver la banda que corresponde al monómero de ambas proteínas y una banda que migra más lenta que la del marcador de peso molecular correspondiente a 62,5 kDa. Estas bandas de mayor masa molecular corresponden a la masa teórica de un dímero. Por lo tanto podemos concluir que a diferencia de MinD o Soj, δ es un dímero en solución (δ_2) independientemente de nucleótido, lo cual se ve confirmado con la dimerización observada con la proteína mutada δ K36A (δ_2 K36A), ya que ésta sería incapaz de unir ni hidrolizar ATP. En presencia del agente químico también se observa una banda que migra más rápido que la forma monomérica. Es posible que esta banda corresponda a una forma de la proteína δ con una migración anómala independiente de la presencia o ausencia de nucleótido.

4.2.2. La proteína δ_2 tiene una débil actividad ATPasa estimulada por ω_2 unida a ADN con la secuencia *parS*

La proteína δ_2 , es parte de una familia de ATPasas que presentan un motivo de Walker A diferente del consenso. Como se comentó en la Introducción, estas proteínas tienen una débil actividad ATPasa que suele ser modulado por la segunda proteína del sistema de partición. La actividad ATPasa de δ_2 fue medida y se encontró que efectivamente es muy débil, y que se necesitan hasta 180 min para obtener medidas significativas (Figura 23B).

La actividad ATPasa de δ_2 sola es baja, pero la proteína ω_2 , que no presenta actividad ATPasa, estimula la hidrólisis de ATP por δ_2 en presencia de ADN (Figura 23B). El grado de estimulación depende de la concentración relativa de la proteína ω_2 (Figura 23A). En presencia de ADN con el sitio *parS* (cualquiera de los sitios de unión de la proteína ω_2) cuando ω_2 se encuentra en baja concentración respecto a δ_2 (0,1:1 hasta 1,5:1), estimula progresivamente la actividad ATPasa hasta llegar a un máximo, luego, con el aumento de la concentración relativa ω_2 : δ_2 (1,5:1 hasta 4:1) la estimulación va decayendo hasta llegar al valor basal de actividad ATPasa de δ_2 sola.

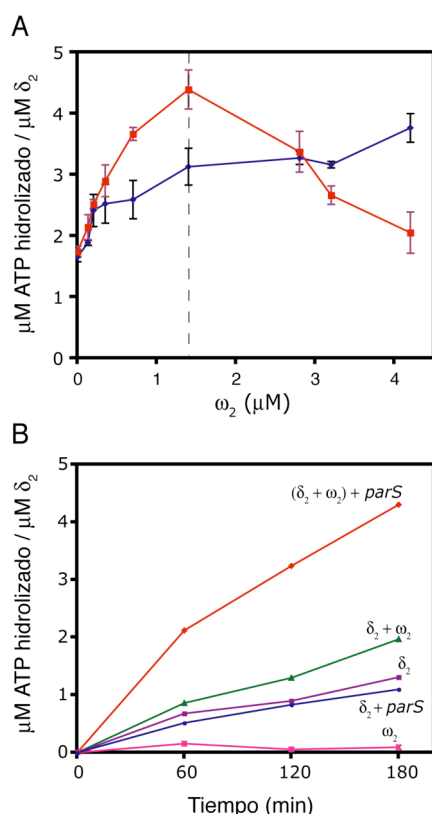


Figura 23. Actividad ATPasa de la proteína δ_2
 (A) Actividad ATPasa de δ_2 (1 μM) en presencia de concentraciones crecientes de ω_2 (0.07 a 4.2 μM) y de 10 μM de ATP, 25 nM de ADN *parS2* (línea roja) o ADN no específico (línea azul) en tampón B a 37°C. (B) Actividad ATPasa de δ_2 o ω_2 solas (línea púrpura y rosa respectivamente) y de δ_2 en presencia de ω_2 (línea verde) o ADN *parS* (línea azul) o en presencia de ω_2 y ADN *parS* (línea roja). Las proteínas entre paréntesis significa que fueron preincubadas 30 min a 37°C antes de añadir el tercer componente, en este caso ADN *parS*. Se cuenta como tiempo 0 el momento en que están presentes los tres componentes. Las concentraciones utilizadas son 1,4 μM de ω_2 y 1 μM de δ_2 .

Sin embargo en presencia de ADN inespecífico, la estimulación va aumentando gradualmente con el aumento de la concentración de ω_2 , descartando cualquier otro efecto presente al incrementar la concentración de la proteína ω_2 .

Se comprobó que ω_2 unida a P_{copS} , P_δ or P_ω estimulaba la actividad ATPasa de δ_2 de manera similar por ello llamaremos a P_{copS} como *parS3*, a P_δ como *parS1* y P_ω como *parS2* y estas secuencias serán usadas indistintamente.

En la figura 23B, se utilizó la concentración de ω_2 que promueve la máxima estimulación de la actividad ATPasa de δ_2 , para observar el efecto de estimulación en función del tiempo e introduciendo variantes en el sistema. La estimulación de la actividad es de 4 a 6 veces en presencia de ω_2 y *parS2*. El aumento de la actividad ATPasa de δ_2 no es significativo cuando solo se añade ω_2 o solo ADN (Figura 23B).

En el apartado anterior se había mostrado que las variantes de la proteína ω_2 que carecían de los 19 primeros residuos es igual que la proteína silvestre en su función como represor transcripcional, mantiene la conformación y se une con similar afinidad y especificidad al ADN consenso. La variante ω_2 T29A, sin embargo, no es capaz de unirse al ADN consenso específicamente y con alta afinidad. Si en los ensayos de actividad ATPasa, se reemplaza ω_2 silvestre por las variantes $\omega_2\Delta 19$ o ω_2 T29A, el efecto de estimulación sobre la actividad ATPasa de δ_2 desaparece (Figura 24).

También se observó que la presencia de los tres componentes (δ_2 , ω_2 y ADN) es necesaria para la máxima estimulación (4 a 6 veces), pero sin embargo, si se añade ω_2 al complejo preformado por δ_2 y ADN *parS* en vez de añadir ADN al complejo preformado por δ_2 y ω_2 , la actividad ATPasa aumenta solo 2 o 3 veces (Figura 24).

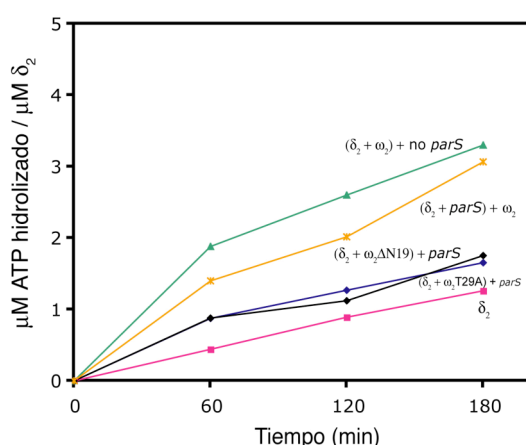


Figura 24. Actividad ATPasa de la proteína δ_2 en presencia de las variantes de ω_2 .

Se muestra la actividad ATPasa de δ_2 (sola línea rosa), y de δ_2 en presencia de $\omega_2\Delta 19$ y ADN *parS* (línea azul), con ω_2 T29A y ADN *parS* (línea negra), en presencia de ω_2 y ADN inespecífico (línea verde), y en presencia de ω_2 y *parS* como en la figura 23, pero variando el orden de adición (línea naranja). Entre paréntesis se muestra los componentes de la reacción que fueron preincubados 30 min a 37°C antes de añadir el tercer componente. Se cuenta como tiempo 0 el momento en que están presentes los tres componentes. Las concentraciones utilizadas son 1 μ M de δ_2 , 1,4 μ M de ω_2 , de $\omega_2\Delta 19$ y de ω_2 T29A.

Como se esperaba, la proteína δ_2 K36A no presenta actividad ATPasa detectable y la adición de ω_2 no introduce ningún cambio (no mostrado). Estos experimentos sugieren que para modular la actividad ATPasa de δ_2 , es necesaria la unión de ω_2 al ADN así como el N-terminal de la proteína ω_2 . Esta es la primera indicación de que esta región presuntamente

desordenada (residuos 1 al 19) que no es necesaria para la unión de ω_2 al ADN ni para realizar su función como represor transcripcional, podría estar implicada en la interacción con la proteína δ_2 y en la función de ω_2 formando parte de un sistema de partición activa.

4.2.3. Unión de ω_2 y δ_2 al ADN

Se realizaron ensayos de retraso en gel y de protección a DNasa I con ADN inespecífico y ADN conteniendo la secuencia *parS*, con la proteína ω_2 y δ_2 . La proteína δ_2 , que no presenta ningún dominio claro de unión a ADN, se une al ADN con muy baja afinidad, y de manera dependiente de ATP. La afinidad depende del tamaño del fragmento de ADN, y es independiente de secuencia (Tabla 12).

Tabla 12. Unión de la proteína δ_2 a ADN

Proteína	Fragmento de ADN	Nucleótido	$k_{d,app}$ *
δ_2	<i>parS</i> ^a	ATP	0.3 μ M
δ_2	<i>parS</i>	ADP	2.5 μ M
δ_2	<i>parS</i>	-	2.5 μ M
δ_2	No- <i>parS</i> ^b	ATP	0.3 μ M
δ_2	pequeño <i>parS</i> ^c	ATP	2 μ M
δ_2	pequeño <i>parS</i>	ADP	> 3 μ M
δ_2 K36A	<i>parS</i>	ATP	2 μ M
δ_2 K36A	<i>parS</i>	ADP	2.5 μ M
δ_2 K36A	pequeño <i>parS</i>	ATP	> 3 μ M
δ_2 K36A	pequeño <i>parS</i>	ADP	> 3 μ M

* $k_{d,app}$ calculada por ensayos de retraso en gel.

^a Fragmento *HindIII-KpnI* de 423 pb conteniendo el sitio *parS2* (P_{ω}). ^b Fragmento de *KpnI-BamHI* de 473 pb de ADN sin secuencia específica. ^c Fragmento *HindIII-KpnI* de 66 pb con dos repeticiones en orientación directa y una inversa ($\rightarrow\rightarrow\leftarrow$).

La proteína δ_2 K36A, que es incapaz de hidrolizar ATP, tiene muy baja afinidad por el ADN, comparable a la de δ_2 en presencia de ADP o ausencia de nucleótido. Se incorporaron a los experimentos de unión a ADN, las proteínas ω_2 , $\omega_2\Delta 19$ y ω_2 T29A. Como fue descrito previamente, ω_2 y $\omega_2\Delta 19$ forman complejos discretos en ensayos de retraso en gel, mientras que ω_2 T29A no interacciona con el ADN específicamente o lo hace con muy baja eficiencia y de modo similar a ADN específico o no específico (Figura 25A, panel superior, calles 2 a 7). En presencia de ATP y δ_2 , se pueden observar complejos ternarios con diferente movilidad a aquellos formados por cada una de las proteínas. Estos complejos son diferentes según se adicione ω_2 , $\omega_2\Delta 19$ o ω_2 T29A. En el caso de ω_2 silvestre, el complejo se mantiene, incluso es de menor movilidad a mayor concentración de ω_2 (Figura 25A, panel superior, calles 8 y 9). En el caso de $\omega_2\Delta 19$, la posible interacción con δ_2 es diferente, ya que cuando aumenta la

concentración de $\omega_2\Delta 19$, el complejo que se observa es el mismo que con $\omega_2\Delta 19$ sola. Cuando se añaden $\omega_2\text{T29A}$ y δ_2 , se observa el complejo que forma δ_2 más definido.

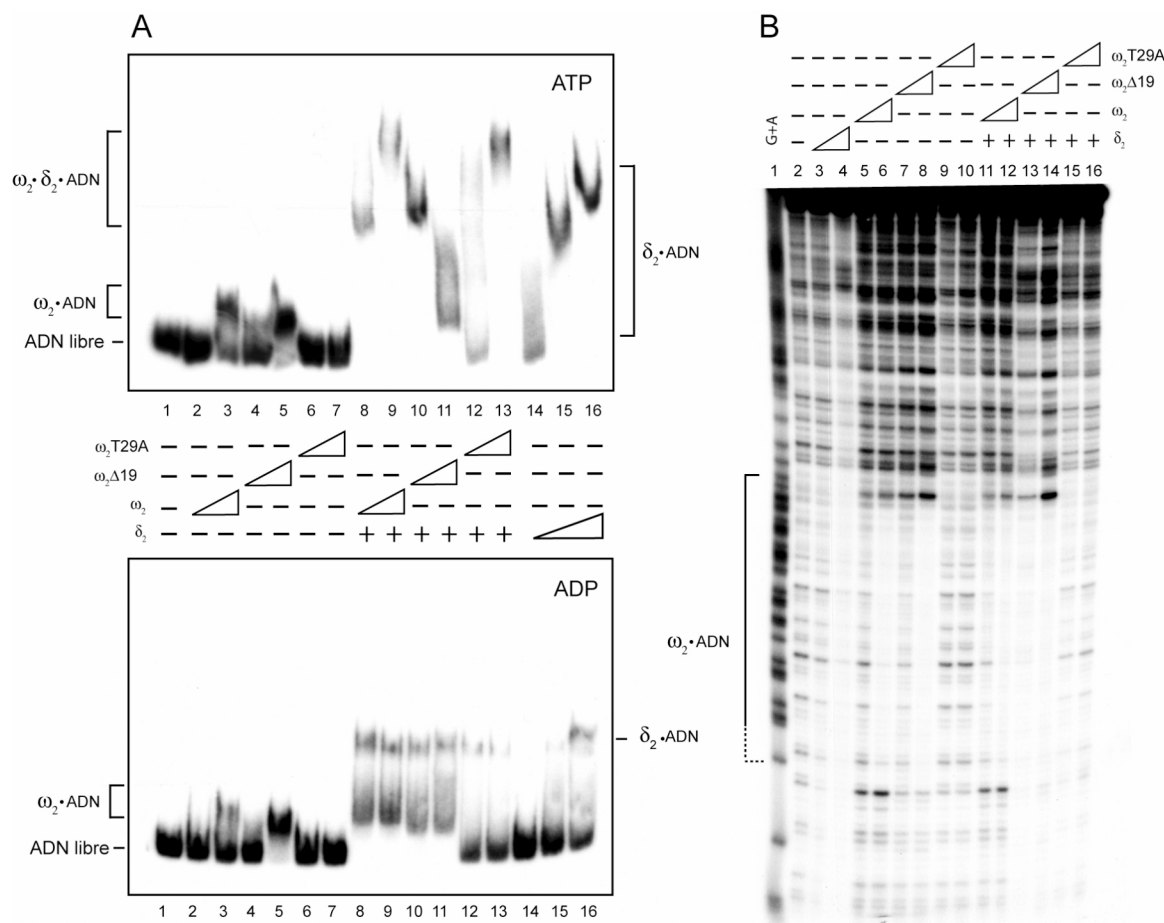


Figura 25. La proteína ω_2 desplaza a δ_2 del ADN

(A) El fragmento de ADN [$\alpha^{32}\text{P}$]-*HindIII-KpnI* de 423 pb (0,5 nM) se incubó durante 15 min a 37 °C en tampón B con 1 mM ATP (panel superior) o 1 mM ADP (panel inferior) con concentraciones crecientes de ω_2 (6 y 12 nM), $\omega_2\Delta 19$ (8 y 18 nM) o $\omega_2\text{T29A}$ (8 y 18 nM) en la ausencia (calles 2 a 7) o en presencia de una cantidad constante (0,7 μM , calles 8 a 13) de la proteína δ_2 y con cantidades crecientes de la proteína δ_2 (0,35, 0,7 y 1,4 μM , calles 14 a 16). El símbolo – indica ausencia de proteína, $\omega_2\bullet\text{ADN}$, indica el complejo de ω_2 unida al ADN, $\delta_2\bullet\text{ADN}$, δ_2 unida al ADN y $\omega_2\bullet\delta_2\bullet\text{ADN}$, un posible complejo ternario conteniendo ω_2 , δ_2 y ADN. (B) El fragmento de ADN [$\alpha^{32}\text{P}$]-*HindIII-KpnI* de 423 pb (1 nM) se incubó durante 15 min a 37 °C en tampón B con 1 mM ATP con concentraciones crecientes de ω_2 (6 y 12 nM), $\omega_2\Delta 19$ (8 y 18 nM) o $\omega_2\text{T29A}$ (8 y 18 nM) en la ausencia (calles 5 a 10) o en presencia de una cantidad constante (0,7 μM , calles 11 a 16) de la proteína δ_2 y con cantidades crecientes de la proteína δ_2 (0,35, 0,7 μM , calles 3 y 4). El marcador de peso molecular G + A esta en la calle 1. La región del ADN protegida del ataque de DNasa I por ω_2 se indica como $\omega_2\bullet\text{ADN}$.

En ausencia de ATP (no mostrado), o con ADP, la presencia de δ_2 , incrementa la afinidad de ω_2 y $\omega_2\Delta 19$ por el ADN aproximadamente tres veces pero no se observan los complejos de baja movilidad (Figura 25A, panel inferior, calles 8 a 11). Estos experimentos parecen indicar dos formas diferentes de interacción entre la proteína ω_2 y δ_2 , una dependiente de ATP y de la región N-terminal de ω_2 y otra independiente de nucleótido y de esa región. Para obtener más información sobre los diferentes complejos observados, se realizaron experimentos de

protección a DNasa I (Figura 25B) con las mismas condiciones que se utilizaron para los ensayos de retraso. Se observa que δ_2 protege al ADN extensiva e inespecíficamente. Esta interacción es dependiente de ATP y de la concentración de δ_2 (Figura 25B, calles 3 y 4). Al estar presente ω_2 , δ_2 es desplazada del ADN, ya que solo se observa la protección sobre las repeticiones, que es el patrón de protección típico de ω_2 (Figura 25, calles 5 y 6), sin embargo cuando se añade $\omega_2\Delta 19$, se observa el patrón de protección de ambas proteínas. Como se esperaba, la proteína ω_2T29A es incapaz de proteger al ADN en una región específica, aún en presencia de δ_2 . Es interesante destacar aquí que el complejo de baja movilidad que se observa en la Figura 25A, calles 8 y 9, se corresponde a las calles 11 y 12 de la Figura 25B y allí se observa que sólo parece estar unida directamente al ADN la proteína ω_2 .

En la figura 26 se investiga el efecto del ATP y el ADP en la interacción de ω_2 y δ_2 con el ADN por ensayos de protección a DNasa I. Nuevamente, ω_2 protege el sitio consenso de unión, mientras que $\delta_2 \cdot \text{ATP}$ protege al ADN inespecíficamente, pero $\delta_2 \cdot \text{ADP}$ no puede hacerlo (Figura 26, calles 7 y 10 respectivamente). El mismo efecto de “quitar” a δ_2 del ADN se observa cuando esta presente ω_2 , en presencia de ATP, aún a altas concentraciones de δ_2 . Sin embargo, en presencia de ADP, solo se observa la huella dejada por la unión de ω_2 . (Figura 26, calles 8 y 9).

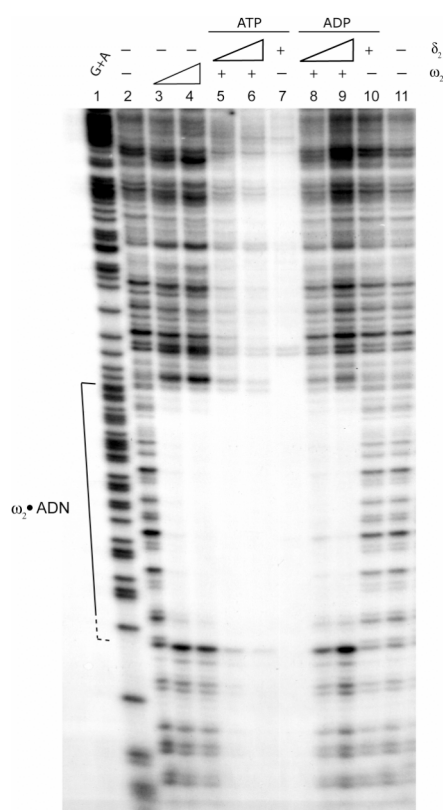


Figura 26. Ensayo de protección a Dnasa I con los complejos $\omega_2 \cdot \text{DNA}$ o $\omega_2 \cdot \delta_2 \cdot \text{DNA}$

El fragmento de ADN [$\alpha^{32}\text{P}$]-*HindIII-KpnI* de 423 pb (1 nM) se incubó durante 15 min a 37 °C en tampón B con 1 mM ATP o 1 mM ADP, con concentraciones crecientes de ω_2 (6 y 12 nM, calles 3 y 4), crecientes de δ_2 (2.2 and 4.4 μM , calles 5, 6, 8 y 9) en presencia de ω_2 (6 nM) o una concentración fija de δ_2 (4.4 μM , calles 7 y 10). La región del ADN protegida del ataque de DNasa I por ω_2 se indica como $\omega_2 \cdot \text{ADN}$.

4.2.4. Polimerización de la proteína δ_2 en presencia de ω_2 y *parS*

En el apartado anterior se muestra que δ_2 forma complejos de baja movilidad con el ADN, y que lo protege extensivamente en ensayos de DNasa I. Además, varias proteínas pertenecientes a la familia de ATPasas involucradas en partición forman filamentos por sí mismas, o en presencia de una superficie activadora (lípidos, ADN) (Barilla y col., 2005; Bouet y col., 2007; Ebersbach y col., 2006; Leonard y col., 2005; Suefuji y col., 2002). Esto nos llevo a investigar la capacidad de δ_2 de formar polímeros.

4.2.4.1. ω_2 y no $\omega_2\Delta 19$, coprecipita con δ_2

Se realizó un experimento de centrifugación para determinar si se formaban estructuras de alto peso molecular que pudieran precipitar después de ser centrifugadas a fuerzas relativamente bajas (~ 20.000 g). Se encontró que δ_2 se encuentra en el sobrenadante en ausencia de ADN (Figura 27, panel 3). En presencia de ADN y ATP, una fracción mayoritaria de δ_2 se encuentra en el precipitado (Figura 27, panel 1), mientras que en presencia de ADN y ADP la mayoría de la proteína permanece en el sobrenadante (Figura 27, panel 2).

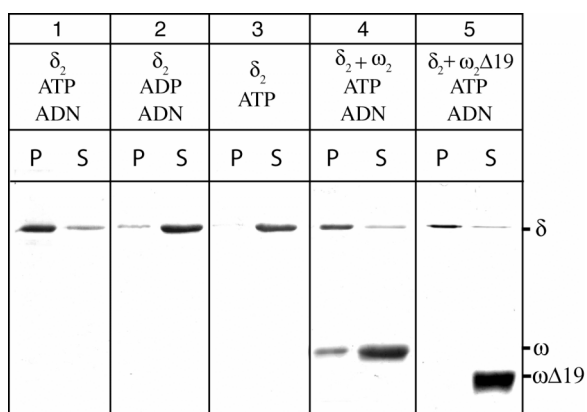


Figura 27. Ensayo de precipitación.

P: Precipitado, S: Sobrenadante. Las proteínas indicadas fueron incubadas en tampón B, durante 30 minutos a 37°C y luego centrifugadas a 20000 g, durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante, y los precipitados fueron resuspendidos en el mismo volumen. La presencia de las proteínas en el precipitado o en el sobrenadante se analizó por SDS-PAGE utilizando geles del 12 % (paneles 1, 2 y 3) o del 17,5% (paneles 4 y 5). Luego se tiñeron con Azul de Coomassie. La concentración de δ_2 utilizada fue de 3,5 μ M y la de ω_2 o $\omega_2\Delta 19$, 2,5 μ M, el ADN se utilizó a 25 nM.

Se estudió el comportamiento de la proteína δ_2 pero en presencia de las proteínas ω_2 y $\omega_2\Delta 19$. La proteína δ_2 vuelve a estar en el precipitado en presencia de ADN y ATP, y se destaca que una fracción de la proteína ω_2 coprecipita con δ_2 (Figura 27, panel 4). Este dato es aun más interesante al observar que la variante $\omega_2\Delta 19$, que tiene las mismas propiedades que la silvestre respecto a unión a ADN, no se encuentra en el precipitado (Figura 27, panel 5). Estos experimentos estarían indicando la formación de estructuras de alto peso molecular formadas por δ_2 y ADN en presencia de ATP, y dan una indicación indirecta de una interacción de δ_2 con ω_2 a través de la región N-terminal de ω_2 . La proteína ω_2 , en ausencia de la proteína δ_2 permanece en el sobrenadante aún en presencia de ADN (no mostrado).

4.2.4.2. La proteína δ_2 polimeriza sobre el ADN en presencia de ATP y ω_2 .

Para investigar la formación de polímeros se intentó visualizar su formación por microscopía electrónica. Utilizando la técnica de tinción negativa, con la que no es posible ver al ADN desnudo, se observó la formación de estructuras compatibles con un nucleofilamento. En la Figura 28A se muestran las estructuras obtenidas cuando se incubaba la proteína δ_2 , junto con la proteína ω_2 , ADN linearizado y ATP. No fuimos capaces de encontrar estructuras similares cuando se omite el ADN, el ATP (Figura 28B), la proteína ω_2 , o si la proteína ω_2 se reemplaza por $\omega_2\Delta 19$. Dado que la proteína ω_2 solo protege la región *parS* y nunca se extiende a todo el ADN sustrato, asumimos que es la proteína δ_2 quien polimeriza sobre el ADN.

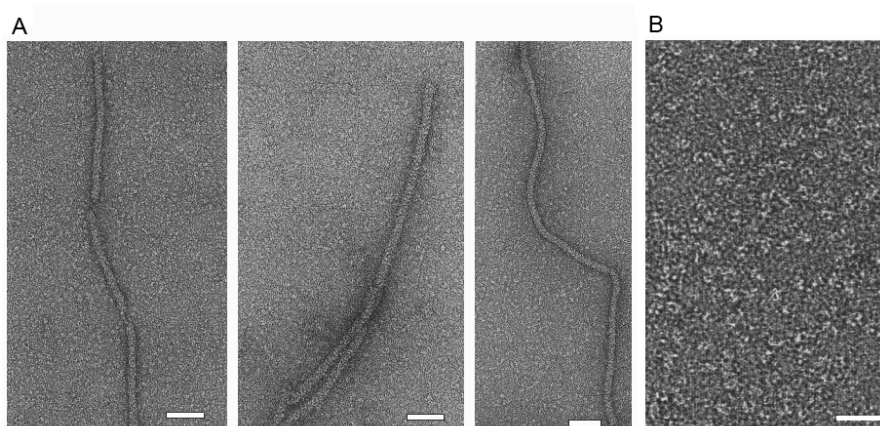


Figura 28. La proteína $(\delta \cdot \text{ATP})_2$ forma filamentos sobre el ADN.

Fotografías de microscopía electrónica muestran la formación de filamentos nucleoproteicos por la proteína δ_2 (A) en presencia de ADN lineal con una secuencia *parS*, ω_2 y 1 mM de ATP. (B) Igual que en (A) pero en ausencia de ATP, no se observa formación de filamentos. La barra de escala indica 50 nm.

Por la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) se intentó caracterizar a tiempo real y en detalle la polimerización por parte de δ_2 . La formación de polímeros es estrictamente dependiente de la presencia de ADN, ATP y ω_2 (Figura 29, línea roja).

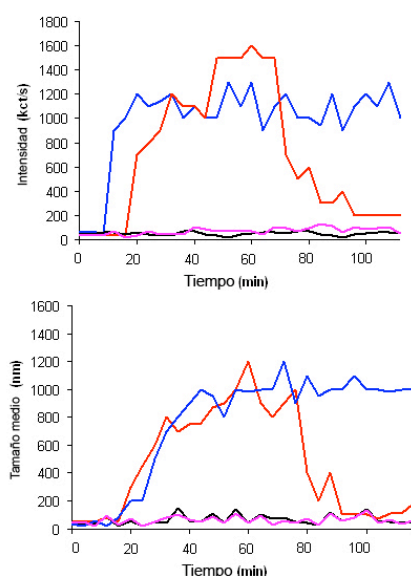


Figura 29. Polimerización de la proteína δ_2

Aumento de la intensidad de la luz dispersada (kcts/s, panel superior) y el tamaño medio del polímero (en nm, panel inferior) en el tiempo, medido por el método de dispersión dinámica de la luz. Las proteínas δ_2 (1 μM), ω_2 (4 μM , líneas roja, azul o negra) o $\omega_2\Delta 19$ (4 μM , línea púrpura) y ADN lineal *parS1* (25 nM) fueron mezcladas en tampón B e incubadas por 1 minuto en hielo, las reacciones comenzaron tras la adición de 1 mM de ATP (línea púrpura o roja), ATP γ S (línea azul) o ADP (línea negra).

La polimerización de δ_2 depende de la unión a ATP pero no de su hidrólisis ya que en presencia del análogo no hidrolizable ATP γ S se produce también polimerización (Figura 29, línea azul) pero no se observa despolimerización. El incremento en masa muestra un patrón sigmoideal que alcanza su máximo alrededor de los 30 min. El incremento de luz dispersada puede ser relacionado con el tamaño del polímero y en este caso, se forman estructuras de aproximadamente 1 μ m. En las condiciones del ensayo, después de 75 minutos, la intensidad de la luz dispersada disminuye hasta los valores iniciales. Cuando se añade ATP a los 120 minutos, se inicia un nuevo ciclo de polimerización (no mostrado) indicando que el ATP compete con el complejo δ_2 •ADP. En concordancia con todos los datos previos, no se observa polimerización cuando se reemplaza el ATP por ADP o se reemplaza a la proteína ω_2 por $\omega_2\Delta 19$ (Figura 29, líneas violeta y negra, respectivamente).

Al igual que en los ensayos de ATPasa, en este caso es importante la relación de concentraciones de ω_2 respecto a la de δ_2 . Cuando están en una relación molar 1:1, no se observa prácticamente aumento en la dispersión de la luz (datos no mostrados).

4.2.5. La presencia de δ_2 y ω_2 promueve el apareamiento de plásmidos por los sitios centroméricos

La formación de complejos entre δ_2 , ADN con la región *parS* y ω_2 ($\omega_2\Delta 19$ o ω_2T29A) se investigó por microscopia electrónica. En este caso se utilizó una técnica que permite ver el ADN y las proteínas. Se incubaron las proteínas indicadas y el ADN, en presencia y ausencia de ATP, y luego fueron preparadas como se describe en Materiales y Métodos. El ADN utilizado para este experimento fue un plásmido de 3100 pb linearizado y que a 320 pb de uno de los extremos contiene el sitio *parS2*.

En la figura se muestran campos típicos de cada condición, a la derecha de las fotos se ilustran las posibles interacciones. El ADN desnudo visualizado por esta técnica puede verse en la Figura 30A. En presencia de ATP, la proteína δ_2 forma complejos con el ADN en sitios discretos en el 85% de las moléculas (n=200), al medir el contorno de las moléculas de ADN, se pudo determinar que la posición de estos complejos es al azar (Figura 30B, flechas blancas). Al incubar el ADN lineal con ω_2 (60 nM), aproximadamente el 40 % de las moléculas (n=250) muestran a la proteína ω_2 unida a su sitio específico (Figura 30C, flechas negras). Esta observación se confirma midiendo las moléculas, y comprobando que la distancia entre la proteína observada y el extremo del ADN corresponde a aproximadamente 320 pb. En la Figura 30C, se muestran estas estructuras, donde también se puede observar que

al unirse ω_2 al ADN, no lo dobla, en concordancia con lo observado en la estructura del cocrystal.

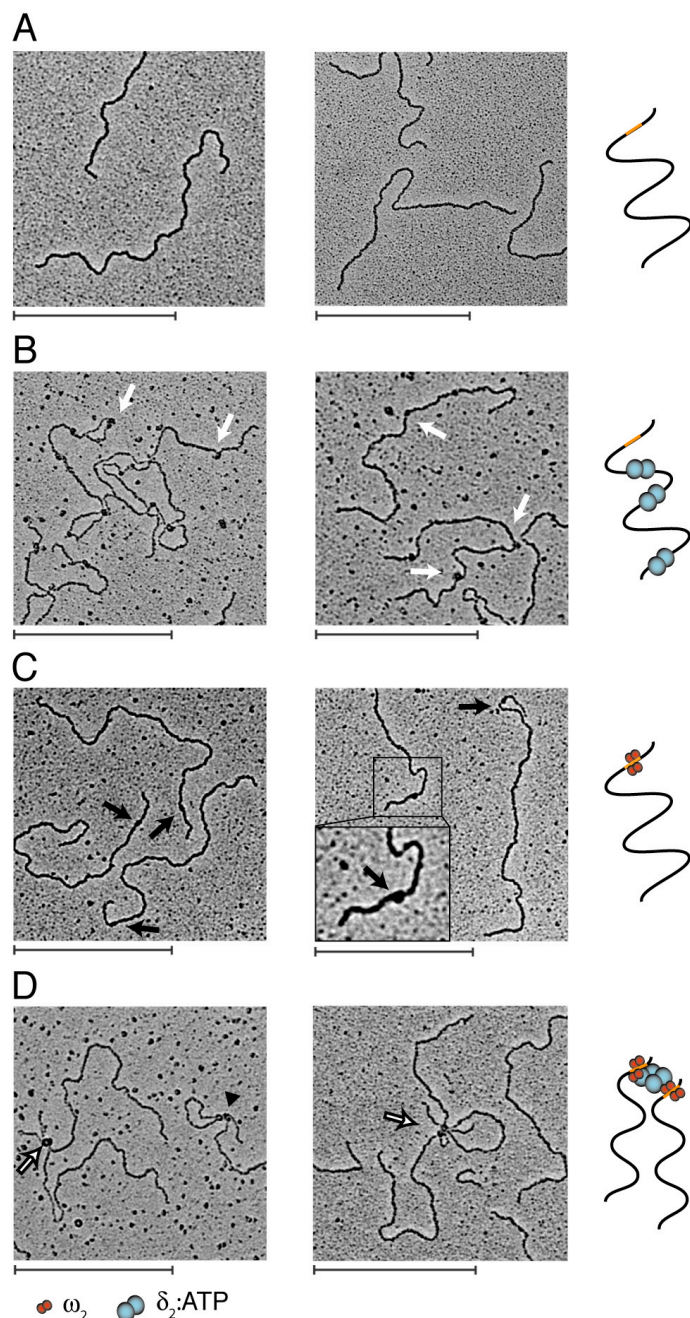


Figura 30. Formación de plásmidos apareados en presencia de δ_2 y ω_2 .

El ADN *parS* lineal de 3.1 kb (el sitio *parS2* está a 320 pb de uno de los extremos, línea amarilla) se incubó con ω_2 (esferas rojas) y/o δ_2 (esferas azules) en tampón B, y se preparó para microscopía electrónica con la técnica de adsorción a mica. (A) ADN *parS2* lineal (1 nM) en presencia de 1 mM ATP. (B) Proteína δ_2 (100 nM) unida al ADN (1 nM) (flechas blancas) en presencia de 1 mM ATP. (C) Proteína ω_2 (60 nM) unida al ADN *parS* (1 nM) en presencia de 1 mM ATP, y detalle de los complejos ω_2 •*parS* (flechas negras). (D) ADN *parS* (1 nM) incubado con δ_2 (100 nM) y ω_2 (60 nM) en presencia de 1 mM ATP, las moléculas apareadas marcadas por flechas. Las barras indican 500 nm. A la derecha de las fotos se muestra un dibujo explicativo que no tiene intención de ser cuantitativo.

Cuando se añade a la reacción ω_2 y δ_2 a la vez en las mismas concentraciones que en la Figura 30B y 30C (en concentración equimolar aproximadamente), se encuentran un 20% ($n=200$) de moléculas de ADN formando estructuras apareadas. La zona donde contactan corresponde con el sitio *parS* (Figura 30D). En la figura se muestran dos estructuras típicas, en el panel de la izquierda dos moléculas de ADN contactando sólo por el sitio *parS* y en el de la derecha, dos moléculas apareadas pero con un contacto adicional con una región al azar de una de las moléculas de ADN probablemente mediado por δ_2 .

El incremento de la concentración local de ω_2 o de δ_2 , rompe este apareamiento, cualquier cambio en la estequiometría descrita, resulta en la desaparición de este tipo de estructuras, como se observa en la Figura 31B.

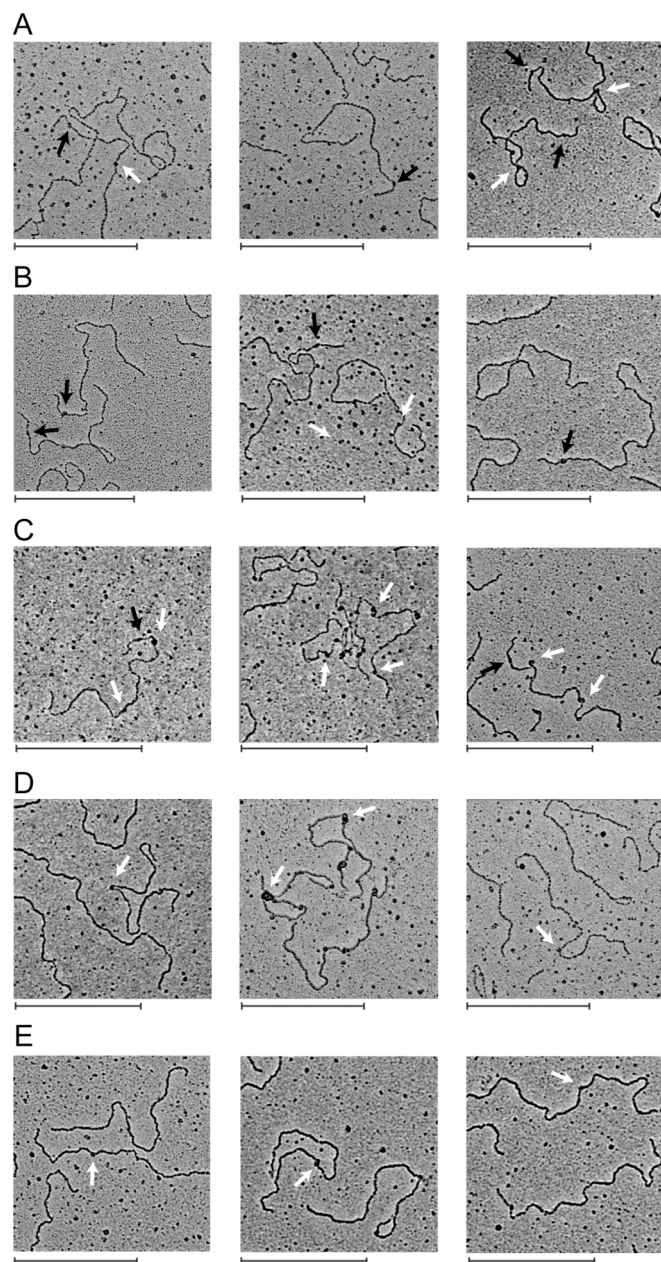


Figura 31. Micrografía electrónica de los complejos ADN•proteína.

El ADN *parS* lineal de 3.1 kb se incubó con ω_2 o las variantes $\omega_2\Delta19$ o ω_2T29A y/o δ_2 o la variante δ_2K36A , y se preparó para microscopía electrónica. (A) ADN *parS*2 (1 nM), δ_2 (100 nM) y ω_2 (60 nM) fueron incubados en ausencia de nucleótido. Las flechas negras y blancas marcan los complejos ω_2 •ADN y δ_2 •ADN, respectivamente. (B) ADN *parS*2 (1 nM), δ_2 (100 nM), y el doble de ω_2 (120 nM) se incubaron en presencia de ATP. (C) y (D), ADN *parS*2 (1 nM), δ_2 (100 nM) se incubaron con $\omega_2\Delta19$ (60 nM en C) o ω_2T29A (60 nM en D) en presencia de 1 mM ATP. (E) ADN *parS*2 (1 nM) y δ_2K36A (100 nM) se incubaron en presencia de 1 mM ATP. Las barras indican 500 nm.

Tampoco se observan plásmidos apareados cuando se reemplaza ω_2 por $\omega_2\Delta19$ o ω_2T29A (Figura 31C y 31D respectivamente. En la figura 31C se puede ver la unión de $\omega_2\Delta19$ a su sitio de unión y la de δ_2 en el resto de la molécula. Como se esperaba, no se observaron complejos ω_2T29A •ADN (Figura 31D), solamente se observan aquellos formados por δ_2 . Se estudió también las estructuras que forma la proteína mutada δ_2K36A . En la Figura 31E se indican con flechas blancas los posibles complejos formados por la proteína y el ADN,

consistente con la baja afinidad observada por esta proteína por el ADN. Las formación de estructuras apareadas es dependiente de ATP, en la figura 31A, se omitió el nucleótido y pueden verse complejos formados por ω_2 (flechas negras) y algunos por δ_2 .

4.3. Análisis *in vivo*

4.3.1. Las proteína ω_2 y δ_2 son necesarias para la segregación plasmídica

Para analizar la importancia de las proteínas ω_2 y δ_2 y el sitio *parS* para el mantenimiento estable de un plásmido *in vivo*, se clonaron los genes ω y δ , y las secuencias *parS1* y *parS2* (Figura 5A) en un vector de bajo número de copias sin sistema de partición activa (*par*-) que replica en *B. subtilis* (pHP13). Se clonaron también en el mismo sistema, diferentes combinaciones de los genes y las variantes de las proteínas ω_2 y δ_2 . Con la intención de localizar a la proteína δ_2 en la célula, se hizo una fusión de la proteína δ con la proteína GFP. Se eliminó el codón de parada de la proteína δ y se clonó la secuencia que codifica la proteína GFP dejando 5 aminoácidos entre ellas, que pudieran cumplir el papel de bisagra. De esta manera se obtuvo una proteína de fusión δ -GFP en el C-terminal de δ_2 . Esta construcción también fue introducida en el vector pHP13 para comprobar que la proteína fusionada es aún funcional. Los plásmidos resultantes fueron transformados en *B. subtilis*, las células se crecieron durante 100 generaciones en LB a 30 °C, y se midió la frecuencia de pérdida de los plásmidos. En la Tabla 13, se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 13. Frecuencia de pérdida de plásmidos

Plásmido	Genotipo relevante	Frecuencia de pérdida /generación ^b
pHP13	<i>par</i> ⁻	$3,2 \times 10^{-3}$
pCB706	Sitio <i>parS1</i> , genes δ y ω	$3,3 \times 10^{-4}$
pCB702	sitio <i>parS1</i> , genes δ -gfp y ω	$3,1 \times 10^{-4}$
pCB578	sitio <i>parS1</i> , gen δ -gfp	$4,0 \times 10^{-3}$
pCB586	sitio <i>parS2</i> y gen ω	$2,7 \times 10^{-3}$
pCB703	Sitio <i>parS1</i> , genes δ y $\omega\Delta 19$	$5,3 \times 10^{-3}$
pCB705	sitio <i>parS1</i> , genes $\delta K36A$ -gfp y ω	$4,3 \times 10^{-3}$

^b Tasa de pérdida calculada como $L=1-(P)^{1/n}$ donde P es el porcentaje de células que retienen el plásmido y n es el número de generaciones.

Los plásmidos pCB706 y pCB702, que llevan un sitio *parS* y los genes δ y ω o el sitio *parS* y los genes δ -gfp y ω , se mantienen en la célula 10 veces mejor que el plásmido que no lleva el sitio *par*. Esta frecuencia de pérdida teórica para el vector pHP13 sería de $3,3 \times 10^{-3}$ por generación y esto se corroboró experimentalmente. La tasa de pérdida para los plásmidos pCB706 y pCB702 es de $3,3 \times 10^{-4}$ y $3,1 \times 10^{-4}$ por generación, respectivamente (Tabla 13).

La estabilidad del plásmido no se ve incrementada cuando falta uno de los genes δ -gfp o ω , o cuando se reemplaza el gen ω por la variante $\omega\Delta 19$ o si el gen δ silvestre es reemplazado por el gen $\delta K36A$. (Tabla 13). De este resultado se pueden extraer conclusiones importantes: a) los genes δ y ω actúan en conjunto con un sitio *parS*, para asegurar la correcta segregación de un plásmido y b) para realizar correctamente esta función se necesita el N-terminal de ω_2 y la actividad ATPasa de δ_2 . Además con este experimento demostramos que la proteína de fusión δ -GFP es funcional y nos proporciona una herramienta para localizar a la proteína en las células.

4.3.2. Localización subcelular de la proteína δ_2 .

Para determinar la localización de la proteína δ_2 en la célula se construyó el plásmido pCB578, que lleva el sitio *parS1* o P_δ y el gen δ -gfp. Las células de *B. subtilis* con este plásmido se crecieron en LB o medio mínimo S7 a 30°C y se prepararon para su visualización en un microscopio de fluorescencia como se describe en Materiales y Métodos. Se encontró que en el 90 % de las células la proteína δ -GFP parece estar asociada con el nucleóide (Figura 32A, a, b y c, tinción con DAPI no mostrada).

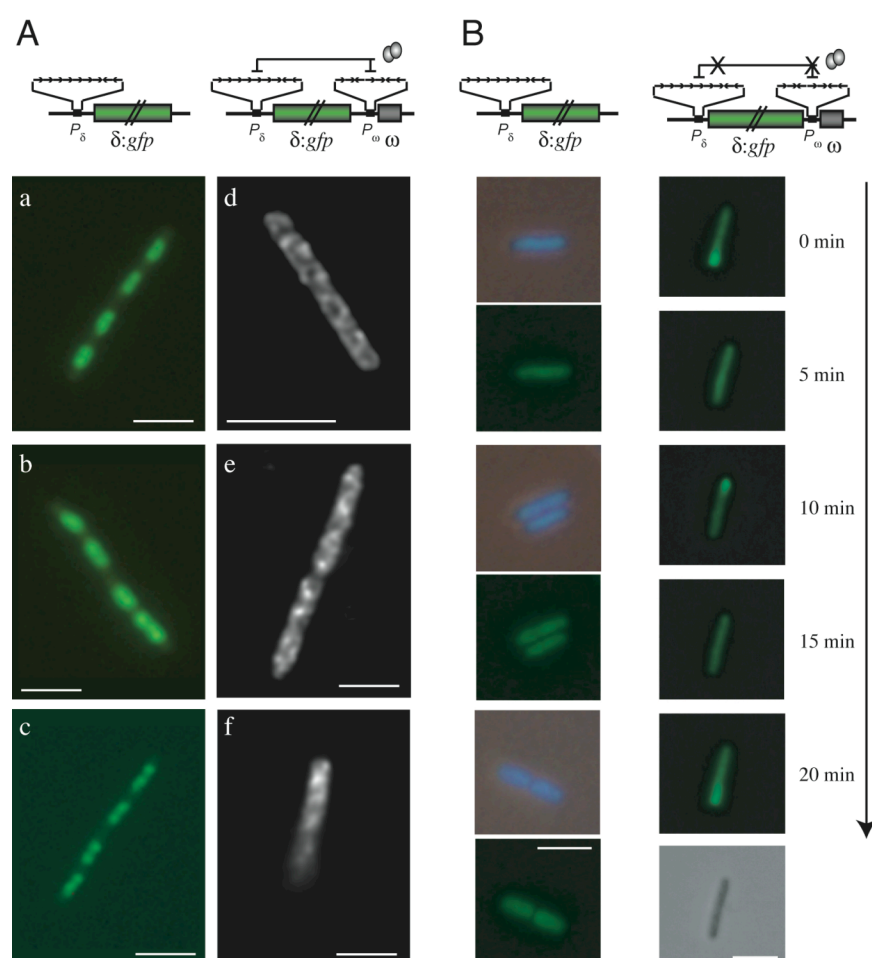


Figura 32. Localización subcelular de δ_2 visualizada como una fusión a GFP.

En la parte superior se indica la presencia en la célula de un plásmido con sitio *parS*, y el gen δ -gfp (izquierda) o uno con el sitio *parS*, y los genes δ -gfp y ω (derecha). (A) Localización de la proteína de fusión δ -GFP en *B. subtilis* en presencia de *parS* y δ -GFP (panel izquierdo) o *parS*, δ -GFP y ω (panel derecho). Las imágenes en el panel derecho son las imágenes deconvolucionadas. (B) Localización de la proteína de fusión δ -GFP en *E. coli* en presencia de *parS* y δ -GFP (panel izquierdo). En el panel derecho se muestra el movimiento de la fusión δ -GFP en *E. coli* en presencia de *parS* y δ -GFP. Las imágenes fueron tomadas cada 5 minutos. Las barras de escala indican 2 μ m.

El sistema utilizado presenta una gran desventaja técnica y es que al estar la proteína δ -GFP bajo el control de su propio promotor, al introducir ω_2 en el sistema, la gran represión que esta proteína ejerce sobre el P_δ resulta en que prácticamente no se pueda visualizar la proteína de fusión. Pero esta fuerte regulación es la que está presente en el sistema silvestre. Se transformó en *B. subtilis* el plásmido pCB702 (sitio *parS1*, genes *δ -gfp* y *ω*). Como se esperaba, la señal de δ -GFP, apenas es mayor que el ruido de fondo (no mostrado). Para poder visualizar la localización de δ -GFP en presencia de la proteína ω_2 , se utilizó procesamiento de imagen. Con el programa de deconvolución asociado al microscopio de fluorescencia se pudo obtener resultados confiables. Se deconvolucionaron imágenes obtenidas previamente, en 2 dimensiones (Figura 32A, e y f) y se observó que la señal no se encuentra asociada al nucleóide sino dispersa en la célula y en algunos casos hacia un polo de la célula. Las imágenes así obtenidas muestran que δ -GFP forma estructuras organizadas dentro de la célula con un patrón helicoidal. La imagen que se muestra en la figura 32A panel d, fue obtenida realizando cortes cada 100 nm en el eje Z, y luego deconvolucionando la pila de imágenes obtenida. Este tipo de imágenes solo se observaron en presencia de ω_2 .

Con la intención de poder ver un efecto más claro de ω_2 como proteína del sistema de partición y no como represor transcripcional, decidimos trasladar el sistema a *E. coli* donde la proteína ω_2 no funciona como represor (Figura 32B), quizás porque sea incapaz de interactuar con la ARN polimerasa heteróloga. Probablemente el sistema de partición funcione en *E. coli* ya que se demostró que el sistema cromosomal de *B. subtilis* formado por Soj, Spo0J y un sitio *parS*, es capaz de estabilizar un plásmido en *E. coli* (Yamaichi y Niki, 2000). Como se comentó previamente, la proteína Soj es homóloga a δ_2 . Los plásmidos pCB578 y pCB702, fueron construidos sobre un vector pHP13 que es capaz de replicar en células de *E. coli* utilizando al replicón de ColE1 con un número de copias cercano a las 200 por célula.

En el caso de células conteniendo el plásmido pCB578 (*parS1* y *δ -gfp*) se observó, al igual que en *B. subtilis*, que la proteína δ -GFP se encuentra sobre el nucleóide (Figura 32B, panel izquierdo, se muestra la señal de GFP y DAPI). En presencia de ω_2 , la señal de GFP se mantiene en los mismos niveles que sin ω_2 , y en células fijadas se observan zonas con mayor intensidad en la señal (no mostrado). Teniendo en cuenta que las proteínas Soj-GFP, MinD-GFP y ParA-GFP del plásmido pB171 oscilan de polo a polo o sobre el nucleóide, se decidió utilizar este sistema para visualizar células vivas a lo largo del tiempo. Se encontró en un 10 % de las células que la señal de δ -GFP mostraba un comportamiento dinámico, oscilando de

un polo al otro, requiriendo unos 20 min para completar un ciclo (Figura 32B, panel derecha) de una manera similar a la observada con Soj-GFP (Marston y Errington, 1999; Quisel y col., 1999).

Para investigar el comportamiento de δ -GFP en *B. subtilis*, pero sin el control transcripcional de ω_2 , se clonaron los genes δ -gfp y $\delta K36A$ -gfp en el plásmido pDR111, un vector integrativo que contiene el promotor Hyperspank, bajo el control del represor LacI. Los plásmidos pDR111- δ -gfp y pDR111- $\delta K36A$ -gfp fueron transformados en *B. subtilis* donde se integraron en el cromosoma en el sitio *amy* (Figura 33A) originando las cepas BG947 y BG949 respectivamente.

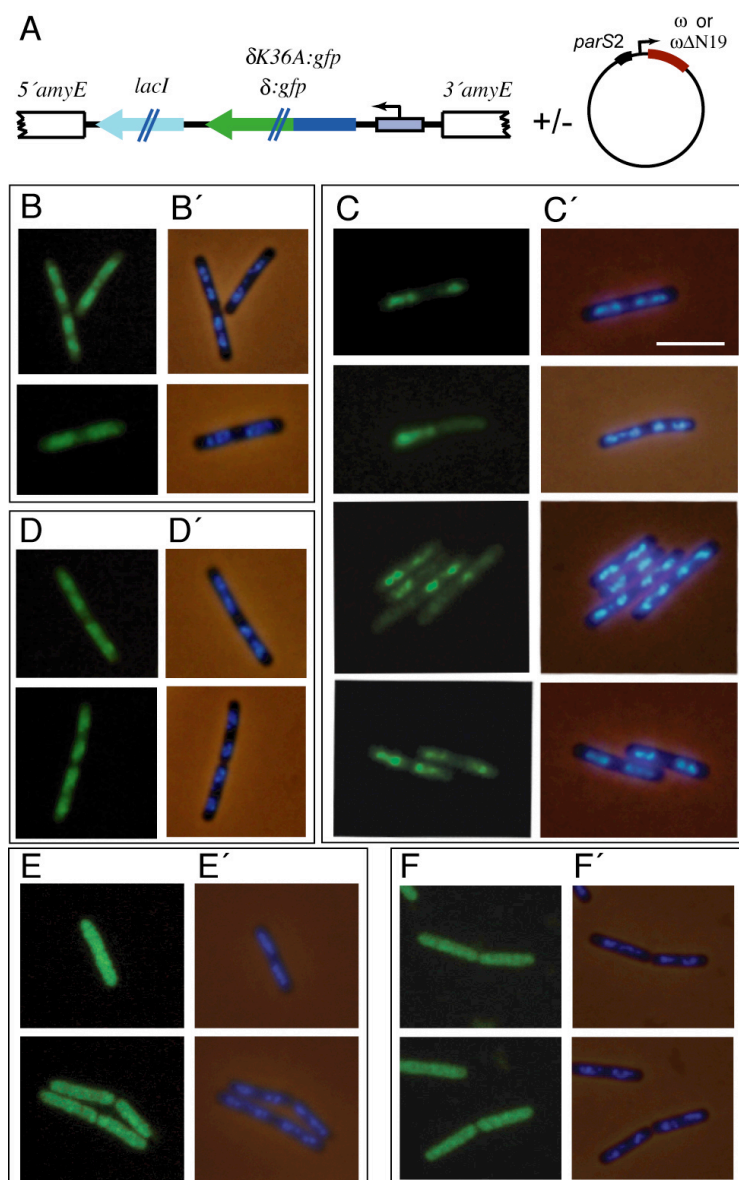


Figura 33. Localización subcelular de δ_2 en presencia de ω_2 o sus variantes.

Se dibuja en (A) el cassette de expresión integrado en el cromosoma de *B. subtilis* y el plásmido que expresa ω_2 o la variante $\omega_2\Delta19$. En los paneles B a F, se muestra la señal de GFP, mientras que de B' a F' se visualiza el ADN teñido con DAPI. (B) δ -GFP, (C) δ -GFP, ω_2 y ADN *parS2*, (D) igual que en (C), pero ω_2 se reemplazó por $\omega_2\Delta19$, (F) como en (B), pero δ -GFP se reemplazó por $\delta K36A$ -GFP y (F) como en (C) pero δ -GFP se reemplazó por $\delta K36A$ -GFP. Todas las muestras fueron tomadas en crecimiento exponencial del cultivo. La barra de escala (en el panel C') indica 2 μ m.

Estas cepas se hicieron competentes para poder transformar con los plásmidos que contienen las diferentes variantes de ω_2 y determinar su influencia en la localización de δ -

GFP. Se observaron primero las células sin ω_2 en *trans*, para calibrar la cantidad de IPTG necesaria para permitir la visualización de δ -GFP. Bajas concentraciones de IPTG (10 μ M) eran suficientes para obtener imágenes como las de la figura 33B. Dada la regulación ajustada que suelen tener estos sistemas (ver Introducción) se quiso comprobar que la expresión de δ -GFP que se obtenía a esta determinada concentración de IPTG era aún funcional para mantener el plásmido.

Se transformó la cepa BG947 con el plásmido pCB586 (*parS2* y ω) y el vector pHP13 vacío y se crecieron las células en presencia de 10 μ M y 50 μ M de IPTG sin selección por antibiótico. Luego de 100 generaciones se calculó la tasa de pérdida y se observó que para el plásmido con ω_2 y el sitio *parS2*, la tasa era similar a la obtenida cuando δ -GFP se encontraba bajo la regulación de ω_2 . (Tabla 14)

En cambio, el vector control, se seguía perdiendo con la misma frecuencia que la esperada por segregación al azar.

Tabla 14. Frecuencia de pérdida de plásmidos II

Plásmido	Genotipo relevante	IPTG añadido (μ M)	Frecuencia de pérdida /generación
pHP13	<i>par</i> ⁻	10	$3,8 \times 10^{-3}$
pHP13	<i>par</i> ⁻	50	$3,1 \times 10^{-3}$
pCB586	sitio <i>parS2</i> , gen ω	10	$3,05 \times 10^{-4}$
pCB586	sitio <i>parS2</i> , gen ω	50	$2,27 \times 10^{-4}$

Una vez validado el sistema se transformaron los plásmidos con ω_2 y sus variantes y se crecieron las células en presencia de 10 μ M de IPTG. En ausencia de ω_2 y el sitio *parS* (Figuras 33B y B') observamos focos discretos que colocan con el nucleóide, de manera comparable a lo observado previamente. En contraste la proteína δ K36A-GFP, se encuentra de forma homogénea por todo el citoplasma de la célula (Figuras 33E y E'). En presencia de ω_2 y el sitio *parS2*, la proteína δ -GFP se reubica, y ya no se encuentra estáticamente asociada con el nucleóide, aparece difusa en algunas células, y en células que tienen dos nucleóides, en el 70 % de los casos, la proteína está concentrada en uno de ellos (Figuras 33C y C'). Este comportamiento es comparable con lo observado en *E. coli*.

Al reemplazar δ -GFP por δ K36A-GFP, la presencia de ω_2 no promueve la reubicación de la proteína mutada. δ K36A-GFP se mantiene distribuida homogéneamente en el citosol de la célula (Figuras 33F y F'). Cuando se reemplaza el gen ω por la variante $\omega\Delta 19$ (Figuras 33D y D') la relocalización de δ -GFP ya no ocurre y la proteína permanece en el nucleóide. Lo mismo se observa al reemplazar el gen ω por la variante $\omega T29A$.

5. Estructura de δ_2

Paralelamente, mientras se llevaba a cabo la caracterización de las proteínas involucradas en este proceso de segregación, en colaboración con el grupo del Dr. Saenger, se elucidó la estructura de δ_2 unida a ATP γ S y Mg²⁺. La estructura se determinó con una resolución de 1.83 Å e incluye los residuos 1 a 284 de la proteína que se expresa *in vivo* (de la Hoz y col., 2000).

5.1. Descripción de la estructura

La estructura confirma que la proteína δ_2 está definida por una hoja β , cubierta a ambos lados por hélices α (Figura 34A). Una hélice α en la región N-terminal, que no se encuentra conservada en otras proteínas de la familia ParA/MinD (Figura 21), cubre el borde de la hoja β que apunta hacia fuera. La formación de un dímero es consistente con los datos bioquímicos mostrados previamente. A pesar de la identidad de secuencia moderada que presenta (18 y 21,5 %, Figura 21) una búsqueda de estructuras similares utilizando el monómero δ utilizando el servidor Dali, se identificaron homólogos estructurales: *Tth*-Soj y *Archaeoglobus fulgidus* MinD (*Afu*-MinD) y otras ATPasas con motivos de Walker fuera del consenso como la nitrogenasa NifH (Schindelin y col., 1997). La similitud estructural entre las ATPasas y el monómero de δ se ve reflejada por la baja desviación del rms 2.2 Å para 232 átomos de C α de *Tth*-Soj superpuestos (Figure 34C, izquierda) y de 3.2 Å para 219 átomos de C α de *Afu*-MinD.

El dímero de δ tiene forma de “V” y en contraste con la similitud de los monómeros, la estructura del homodímero de (δ •ATP γ S)₂ muestra diferencias significativa con los dímeros formados por *Tth*-Soj y *Afu*-MinD, aunque la estructura de los monómeros sea muy similar. Esto se explica porque *Tth*-Soj y *Afu*-MinD son monómeros en ausencia de ATP, pero forman dímeros compactos cuando unen ATP (Cordell y Lowe, 2001; Hayashi y col., 2001; Leonard y col., 2005; Sakai y col., 2001). En el homodímero (*Tth*-SojD44A•ATP γ S)₂, una variante de Soj que presenta una mutación en el Walker A' y une ATP pero es incapaz de hidrolizarlo, se muestra que las moléculas de ATP están completamente enterradas en la interfaz entre los dímeros y que cada ATP interacciona con ambos monómeros de SojD44A (Leonard y col., 2005), sugiriendo que el producto de la hidrólisis de ATP, el ADP solo puede ser liberado si el dímero se disocia. Esto contrasta con el surco profundo que se observa en (δ •ATP γ S)₂, el

cual es lo suficientemente amplio para permitir el intercambio de ATP y ADP sin disociación del dímero.

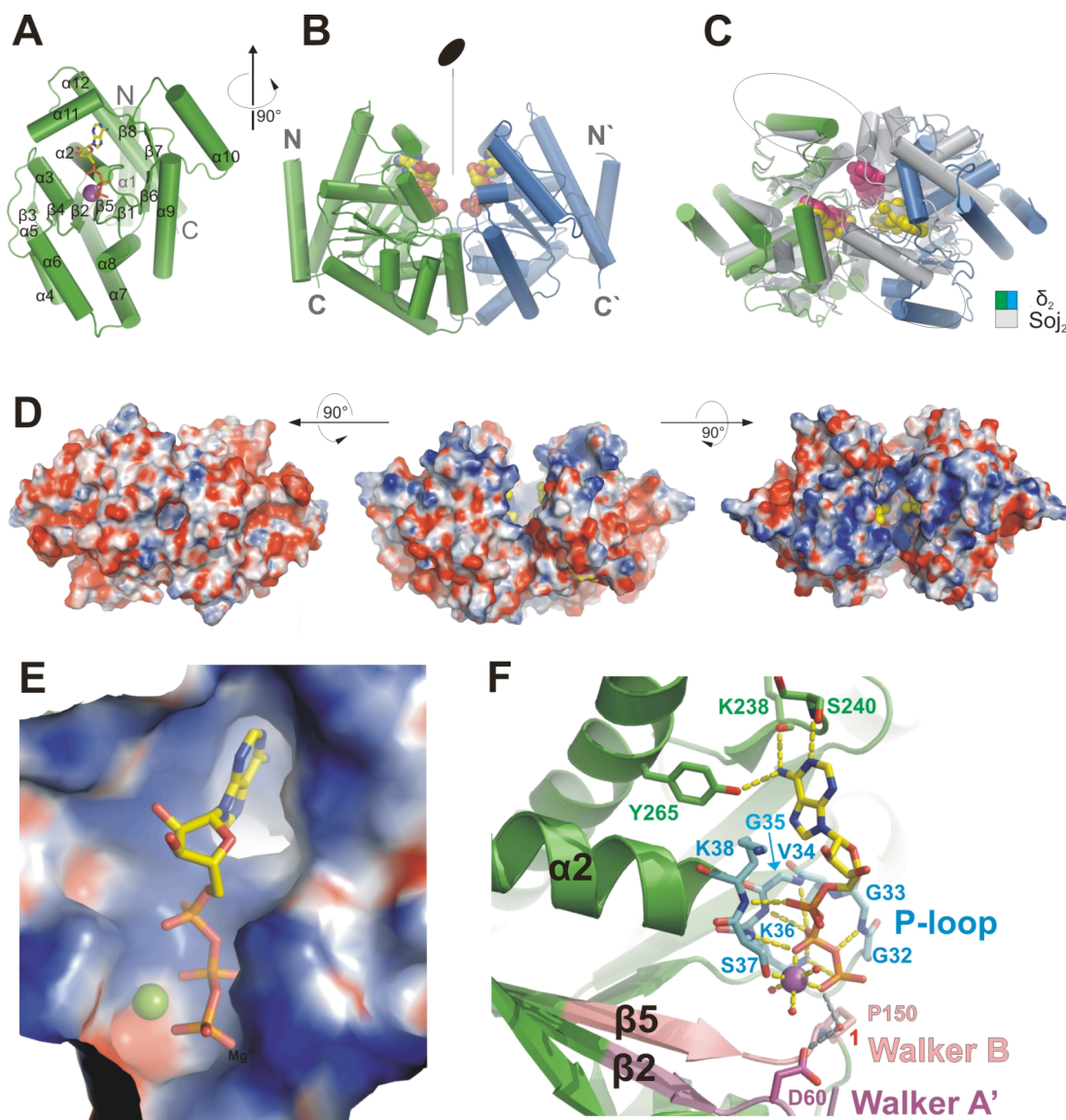


Figura 34. Estructura de la proteína δ_2 en complejo con $\text{ATP}\gamma\text{S}\cdot\text{Mg}^{2+}$.

(A) La estructura secundaria de un monómero de δ se muestra como cilindros (hélices α) y flechas (hojas β), se muestra el ATP γ S y el Mg^{2+} está representado por una esfera púrpura. Se indican con números secuenciales los elementos estructurales (B) Dímero de δ , la segunda subunidad del homodímero se muestra en azul, formando el dímero $(\delta\cdot\text{ATP}\gamma\text{S}\cdot\text{Mg}^{2+})_2$. Las moléculas de ATP γ S se muestran como esferas. El óvalo negro indica el eje que relaciona ambas subunidades en el cristal (C) Superposición de $(\delta\cdot\text{ATP}\gamma\text{S}\cdot\text{Mg}^{2+})_2$ (verde/azul) con *Tih-SojD44A* $\cdot\text{ATP}\gamma\text{S}\cdot\text{Mg}^{2+}$ (gris), vista a lo largo del eje. Las subunidades de la izquierda de ambos dímeros están superpuestas y las de la derecha están movidas de acuerdo a las diferencias estructurales. (D) Representación del potencial electrostático de la superficie de $(\delta\cdot\text{ATP}\gamma\text{S}\cdot\text{Mg}^{2+})_2$. La parte de debajo de la "V" está cargada negativamente (rojo, izquierda) y los extremos de la "V" están cargados positivamente (azul, derecha). (E) potencial electrostático del bolsillo de unión a nucleótido. Se muestran el ATP γ S-Mg $^{2+}$ unido, la esfera verde representa al Mg^{2+} (F) Sitio activo de $(\delta\cdot\text{ATP}\gamma\text{S}\cdot\text{Mg}^{2+})_2$, se señalan los elementos de la estructura secundaria y los puentes de hidrógeno son indicados por las líneas amarillas.

El potencial electrostático de $(\delta\bullet\text{ATP}\gamma\text{S})_2$ es bipolar con la parte de debajo de la “V” cargada negativamente y extremos cargados positivamente (Fig 34D). Esto sugiere que estos últimos pueden estar implicados en la unión al ADN, o también puede estar interaccionando con la parte negativa del siguiente monómero de δ , al formar polímeros. Esta última observación es importante si se piensa en términos de polaridad.

5.2. El sitio de unión a nucleótido.

En el bolsillo de unión a nucleótido cargado positivamente de δ_2 (Figura 34E), el $\text{ATP}\gamma\text{S}$ forma contactos directos y mediados por moléculas de agua (Figura 34F). Se forman puentes de hidrógenos entre la Adenina N6 y la Thr64 y Lys224 y la adenina N1 con la Ser240 (Figura 34F). El trifosfato está coordinado por los residuos $^{36}\text{KSK}^{38}$ del motivo Walker A que forma la región N-terminal de la hélice $\alpha 2$.

La cadena amino de estos residuos forma puentes de hidrógenos con los fosfatos α y β del $\text{ATP}\gamma\text{S}$ mientras que la Lys36 forma puentes salinos con los oxígenos de los fosfatos β y γ . La molécula de Mg^{2+} está coordinada por los oxígenos de los fosfatos β y γ del $\text{ATP}\gamma\text{S}$, la Ser37 y tres moléculas de agua (Figuras 34E y 34F).

El mecanismo de hidrólisis de ATP requiere una molécula de agua catalítica (O_{cat}) que se encuentra en línea con la unión entre el fosfato y el oxígeno β , y es activado por el ataque nucleofílico de una cadena lateral de un aminoácido que actúa como base catalítica. Sin embargo la posible posición del O_{cat} está bloqueada por la Pro150 cerca del motivo de Walker B (Figura 34F y Figura 21). Lo más probable es que la base catalítica sea el Asp60 que se encuentra conservado en el motivo Walker A'. Este residuo está unido por medio de un puente de hidrógeno a una molécula de agua que puede atacar al grupo fosfato γ . Esta atípica alineación de las moléculas reactivas podría explicar la débil actividad ATPasa de esta proteína y de todas las pertenecientes a esta familia.

∴ DISCUSIÓN ∴

Estabilidad del plásmido pSM19035

El plásmido pSM19035, es de amplio rango de hospedador y de bajo número de copias (1 a 3 copias por célula) y se propaga establemente en las células. Para lograrlo utiliza varias de las estrategias descritas para estabilizar un plásmido: (i) controla su replicación de manera ajustada, (ii) maximiza el número de copias, (iii) codifica un sistema toxina-antitoxina (la aportación más importante a la estabilidad). Estas tres funciones se encuentran reguladas por la proteína ω_2 , quien además regula su propia síntesis. Solo faltaba identificar, un sistema de partición activa, la forma más extendida de estabilizar plásmidos de bajo número de copia.

La proteína δ_2 presentaba homología con proteínas involucradas en partición activa y proteína ω_2 podría actuar de manera conjunta con δ_2 . La actividad de ω_2 como represor transcripcional estaba bien documentada, sin embargo no se conocía nada de la proteína δ_2 . En este trabajo abordamos en detalle el modo de unión de ω_2 al ADN (con el cual formaría el complejo de partición además de solaparse con su función de represor transcripcional), las actividades de la proteína δ_2 , y la relación entre ambas como parte del, hasta ahora desconocido, sistema de partición activa del plásmido pSM19035.

Unión de ω_2 al ADN

La proteína ω_2 es un represor transcripcional que pertenece a la familia RHH y forma un dímero en solución, y como tal se une al ADN, ya que el motivo de unión a ADN de las proteínas pertenecientes a esta familia está dado por 2 hojas β antiparalelas, una de cada monómero.

El sitio de unión de ω_2 en las regiones promotoras de *copS*, δ y ω está formado por un grupo de repeticiones adyacentes, de 7 pares de bases cada una (5'-WATCACW-3') (Figura 5A). La caracterización de la unión de ω_2 a varias repeticiones en diferentes orientaciones, llevó a la identificación de un sitio mínimo para la unión de ω_2 compuesto por dos repeticiones conservadas y sin separación entre ellas. A diferencia de los dímeros de Arc que se unen a un subsitio con afinidad en el rango nanomolar (Smith y Sauer, 1996), la proteína ω_2 se une con baja afinidad ($k_{d,app} > 1 \mu M$) a un subsitio, es decir, una repetición. Esto nos lleva a la conclusión de que cada heptámero constituye un semisitio de unión. En trabajos anteriores se determinó por métodos biofísicos que la estequiometría de unión era de un dímero de ω_2 por cada repetición (de la Hoz y col., 2004). Considerando entonces que cada repetición es un

subsitio, el mínimo complejo ADN• ω_2 estaría compuesto por dos repeticiones y un homotetrámero de la proteína ω_2 .

La proteína ω_2 se une cooperativamente y con alta especificidad y afinidad a dos ($k_{d,app} \sim 20$ nM) o más repeticiones sin espaciar ($k_{d,app}$ 4 a 12 nM). Se observó una afinidad reducida (6 veces) de ω_2 por dos repeticiones separadas por 1 a 4 pb. Se han reportado comportamientos similares para otros miembros de la familia RHH cuando sus sitios consenso de unión fueron separados artificialmente (Phillips y col., 1989; Smith y Sauer, 1995).

Las repeticiones en orientación invertida convergente $\rightarrow\leftarrow$ y divergente $\leftarrow\rightarrow$ componen un sitio palindrómico mientras que las repeticiones adyacentes en orientación directa \rightarrow_2 no presentan simetría. Para comprobar si la proteína ω_2 discernía entre estos sitios de unión se estudió la unión a ADN conformado por repeticiones en distinto número y organización. Por medio de las técnicas de retraso en gel y protección al ataque de DNasa I se pudo determinar que la proteína ω_2 se une con muy alta afinidad y cooperatividad a las repeticiones en la orientación \rightarrow_2 o $\rightarrow\leftarrow$ ($K_{d,app} \sim 20$ nM), pero se une con una afinidad 6 veces menor a las repeticiones en la orientación $\leftarrow\rightarrow$ ($K_{d,app} \sim 130$ nM).

La habilidad de ω_2 de unirse a sitios palindrómicos como no palindrómicos es única entre las proteínas de la familia RHH y como muestran los experimentos, las constantes de disociación al unirse a los dos tipos de sitios es comparable. Tres repeticiones en la orientación \rightarrow_3 o $\rightarrow_2\leftarrow$ o cuatro repeticiones orientadas \rightarrow_4 , $\rightarrow_2\leftarrow\rightarrow$ o $\rightarrow_2\leftarrow_2$, son combinaciones a las que ω_2 se une con alta afinidad, comparable con la afinidad que se observa cuando esta presente el sitio completo de las regiones promotoras de los genes bajo la regulación de ω_2 (de la Hoz y col., 2000).

La vida media del complejo ADN• ω_2 es menos de 2 min (de la Hoz y col., 2004), similar a la vida media del complejo CopG•ADN (M.Espinosa, comunicación personal) mientras que en para el complejo formado por el represor Arc es de 30 minutos (Smith y Sauer, 1995).

Experimentos genéticos y bioquímicos muestran que los nucleótidos 5'-ATCAC-3' y la secuencia complementaria 5'-GTGAT-3' son esenciales para la interacción de ω_2 con el ADN. Se realizaron mutaciones en cada base de una de las repeticiones y se midió la $k_{d,app}$ de ω_2 . El experimento demostró que el cambio en cualquier base de la zona central de la repetición disminuía la afinidad de ω_2 por el ADN.

Por medio de la técnica de protección al ataque de agentes químicos se intentó determinar si ω_2 contactaba directamente con todos esos nucleótidos. El patrón de protección mostró que la proteína ω_2 interaccionaba con las bases 5'AT 3' en una de las cadenas y las bases 5' GTG

3' en la cadena complementaria. Se puede observar también que el patrón de interacción se mantiene independientemente de la orientación de la repetición (Figura 9 y 10).

Caracterización de variantes de la proteína ω_2

Las regiones N-terminal (1-23 y 1-22 de las subunidades I y II, respectivamente) de ω_2 no están definidas en el cristal debido a su proteólisis durante la cristalización (Murayama y col., 2001). Es probable que esta zona desordenada en el dímero, como se sugiere por predicción de estructura secundaria y como fue mostrado para proteínas relacionadas de la familia RHH, estudiadas por RMN (Golovanov y col., 2003; Popescu y col., 2005).

Los experimentos *in vivo* muestran que plásmidos que expresan variantes de ω_2 con deleciones desde el amino terminal, $\omega_2\Delta 8$, $\omega_2\Delta 18$ y $\omega_2\Delta 19$ reprimen la utilización del promotor P_δ de manera similar a como lo hace la proteína silvestre. Las variantes $\omega_2\Delta 19$ y $\omega_2\Delta 25$ se unen al ADN con afinidad similar a la proteína silvestre (dos veces de diferencia). Estos datos sugieren que el N-terminal no está involucrado en la unión a ADN con alta afinidad de la proteína ω_2 , al menos hasta el residuo 25.

La deleción de hasta 19 aminoácidos desde el N-terminal tiene muy poca, o ningún efecto sobre la conformación de la estructura central de ω_2 . Estos hallazgos son coherentes con el hecho de que CopG, el miembro más pequeño de la familia de RHH, está formada por solo 45 aminoácidos por monómero y en su forma dimérica es un represor transcripcional completamente activo (Gomis-Ruth y col., 1998).

Es interesante señalar que la variante a la que le faltan los 25 primeros residuos ($\omega_2\Delta 25$) es capaz de unirse a ADN *in vitro* pero *in vivo* no es capaz de reprimir la utilización del promotor P_δ . En esta variante podría estar la clave acerca del mecanismo de represión de ω_2 , dado que aunque es capaz de unirse al ADN operador no puede ejercer represión transcripcional. También se consideran otras posibilidades: (i) que la proteína $\omega_2\Delta 25$ tenga disminuida su estabilidad *in vivo* o *in vitro* (ii) que *in vivo* la vida media del complejo ADN• $\omega_2\Delta 25$ este reducida (iii) que la proteína no se este expresando correctamente *in vivo*. Se están desarrollando experimentos en este sentido para discriminar entre estas posibilidades.

La treonina en la posición 29, en medio de la hoja β , tiene un papel relevante en la unión específica y de alta afinidad al ADN. Este residuo está expuesto al solvente en el cristal de ω_2 y se sospechaba que pudiera tener importancia en la unión, más allá de la Arg31. Los experimentos *in vivo* llevados a cabo, confirman esta hipótesis, ya que esta mutación puntual

elimina completamente la represión sobre un promotor regulado por ω_2 . Dado que las hojas β tienen un papel en la estabilización del dímero (Murayama y col., 2001), y la Thr29 se encuentra inmersa en ellas, investigamos si el efecto por la mutación era debido a un cambio conformacional. Experimentos biofísicos confirmaron que la proteína mantenía la misma estructura secundaria que ω_2 y que se mantenía como dímero (Figuras 13 y 16). Los experimentos bioquímicos mostraron que este residuo es crucial para la especificidad. Esta extraordinaria importancia del residuo Thr29 para el reconocimiento y la unión al ADN, se comprobó con la resolución del cocrystal de $[\omega_2\Delta 19]_2$ ($\rightarrow\rightarrow$) que se detalla a continuación.

Estructura de ω_2 unida al ADN y comparación con otras proteínas de la familia RHH

Las estructura de los cristales de complejos ADN-represor de otras proteína de la familia RHH, MetJ (Somers y Phillips, 1992), Arc (Raumann y col., 1994; Schildbach y col., 1999) y CopG (Gomis-Ruth y col., 1998), muestran que éstos se unen como dos dímeros a sitios palindrómicos. MetJ se une simétricamente a sitios en tandem (Somers y Phillips, 1992), mientras que la interacción de Arc y CopG con sus sitios de unión palindrómicos es asimétrica (Gomis-Ruth y col., 1998; Raumann y col., 1994). La distancia entre los centros de los sitios de unión de los dímeros en el ADN es diferente: MetJ, 8 pb, Arc, 11 pb y CopG 9 pb. La hoja β de cada uno de los represores la forman entre 7 y 9 aminoácidos por monómero en MetJ, Arc y CopG. Sin embargo, solo 5 aminoácidos forman la hoja β de la proteína ω_2 (Murayama y col., 2001) y los centros de cada “subsitio” están separados por 7 pb, coincidiendo con estructura de 7 pb de cada repetición.

Durante la realización de este trabajo se resolvió la estructura de ω_2 (la variante $\omega_2\Delta 19$) en complejo con ADN con repeticiones en diferente orientación. La resolución de estas estructuras nos permitió elucidar las bases estructurales de la unión cooperativa, de alta afinidad y especificidad ω_2 al ADN.

Los residuos directamente implicados en la unión al ADN son la Arg31 y la Thr29 de la hoja β antiparalela y residuos en el C-terminal de la hélice $\alpha 1$ y el N-terminal de la helice $\alpha 2$. (Figura 18). Se muestra que estos residuos interaccionan con las bases 5'-ATC-3' de una cadena y las bases 5'-GTG-3' de la cadena complementaria. Las Thr29 de ambas subunidades del dímero de ω_2 interaccionan de manera similar con las bases, sin embargo el residuo Arg31 (de la subunidad I) interacciona específicamente con una guanina, mientras que la Arg31' (de

la subunidad II) interacciona a través de la Thr29 y de moléculas de agua. Se postuló que esta interacción asimétrica era debida a la ausencia de una guanina en la posición esperada para que interaccionara con la segunda Arg31. Sin embargo, al introducir una mutación en la secuencia consenso de la repetición que posibilitara esta interacción predicha, se observó que el patrón de interacción se mantenía independientemente de la presencia o ausencia de esta guanina.

Estos datos se corroboran con la poca diferencia en afinidad que se encontró al realizar el estudio de mutagénesis de las repeticiones, en donde esta misma sustitución no solo no incrementaba la afinidad de ω_2 por el ADN sino que resultaba en una disminución en la afinidad en 2 veces (Tabla 7). El patrón de interacción que se determinó por ensayos de protección al radical hidroxilo es compatible con las interacciones observadas en el cristal lo que nos permite confirmar que el modelo de interacción predicho por la estructura del cocristal, se observa en solución.

La unión de ω_2 al ADN presenta dos características principales que debemos considerar, la unión de las cadenas laterales de los residuos de las hojas β y la hélice $\alpha 1$ al surco mayor y los grupos fosfatos, respectivamente, y la unión del N-terminal de la hélice $\alpha 2$ por puentes de hidrógeno al esqueleto de fosfatos.

Los estudios de mutagénesis dirigida que se realizaron cambiando cada base por las otras tres en una repetición, muestran que cambios en las bases que no están contactadas directamente por la proteína, también afectan la afinidad de ω_2 por el ADN. La noción de que el ADN libre que cristalizó con las proteínas, presenta pequeñas desviaciones del ADN-B ideal, provee una explicación para esta observación: el cambio en la conformación del ADN debido a la secuencia, añade un elemento de reconocimiento para la proteína ω_2 que aumenta la afinidad y la especificidad de la unión.

A pesar de que Arc, MetJ y CopG unidos al sitio de unión mínimo introducen una curvatura en el ADN de 50 a 60°, la estructura central de la proteína no se modifica significativamente (Gomis-Ruth y col., 1998; Raumann y col., 1994). Sin embargo, Arc₂, CopG₂ y MetJ₂ se superponen con $\omega_2\Delta 19$ unida al ADN, con mayores desviaciones que las proteínas en solución. Esto se explica porque las hojas β de $\omega_2\Delta 19$, compuesta por 5 residuos, es menos protuberante que las de Arc₂, CopG₂ y MetJ₂ (de 7 aa, 8 aa, y 9 aa, respectivamente). De esta manera el N-terminal de la hélice $\alpha 2$ en $\omega_2\Delta 19$ queda alineado con los fosfatos del ADN recto, sin necesidad de introducir una curvatura, como por el contrario hacen las otras proteínas de esta familia descritas, que tienen que doblar al ADN, para colocar el esqueleto de

fosfato a la distancia necesaria para formar los puentes de hidrógeno con las hélices $\alpha 2$. Es interesante destacar, que la distancia entre las bases cuyos fosfatos son contactados por estos residuos, se encuentran a 5 pb de distancia en el complejo con $\omega_2\Delta 19$ mientras en las otras tres estructuras resueltas, están a 6 pb ya que el ADN tienen que recorrer más distancia por la hoja β más protuberante.

Como se comentó previamente, al comparar las estructuras de $[\omega_2\Delta 19]_2 -(\rightarrow\rightarrow)$ y $[\omega_2\Delta 19]_2 -(\rightarrow\leftarrow)$, se pudo determinar que en las hélices $\alpha 1$ se encuentran los residuos que median la interacción entre dímeros y que la distancia entre ambas hélices era prácticamente la misma cuando la proteína estaba unida a repeticiones directas o inversas. Esto está posibilitado por una pequeña distorsión que el dímero B/B' de la estructura $[\omega_2\Delta 19]_2 -(\rightarrow\leftarrow)$ introduce en el ADN, una desviación de 12° (Figura 19) y la rotación de este dímero. Gracias a estos dos movimientos la posición y la orientación de la hélice $\alpha 1'$ de la subunidad B' se mantiene casi a la misma distancia que en $[\omega_2\Delta 19]_2 -(\rightarrow\rightarrow)$ y esto explica las constantes de disociación comparables que muestran estos complejos. En cambio, los complejos con repeticiones en orientación $\leftarrow\rightarrow$, tienen una constante de disociación más alta, y aunque no se consiguió cristalizar este complejo, se puede predecir que las hélices $\alpha 1$ estarían más alejadas siendo perjudicial para la unión cooperativa del segundo dímero. Basados en esto, también se explica la caída en la afinidad cuando se separan las repeticiones.

La extrapolación de las estructuras de $[\omega_2\Delta 19]_2 -(\rightarrow\rightarrow)$ y $[\omega_2\Delta 19]_2 -(\rightarrow\leftarrow)$ nos permitió modelar a la proteína ω_2 unida a su operador natural P_δ o *parS1* (Figura 35). El modelo muestra a la proteína ω_2 unida al ADN recto, como una estructura helicoidal levógira en la que cada dímero está desplazado del dímero adyacente por 7 pares de bases y rotada 252° . En la Figura 35B se muestra que el esqueleto de fosfato del ADN se enfrenta a la cara cargada positivamente de $\omega_2\Delta 19$.

Según este modelo ω_2 envuelve al ADN, lo mismo que sucedería con MetJ, donde los contactos dímero-dímero se producen también a través de las hélices $\alpha 1$. Sin embargo Arc interacciona con el dímero adyacente a través de residuos en el bucle entre las hélices α para formar el tetrámero que se une a una cara de la doble hélice del ADN. CopG también se establece como tetrámeros que se unen a una cara del ADN, pero las interacciones están reforzadas por contactos entre las hélices $\alpha 2$. El extremo N-terminal de MetJ está involucrado en la unión al corepresor S-adenosilmetionina, mientras que en Arc se encuentra sin estructura pero se ordena al unirse al ADN y contribuye a la unión.

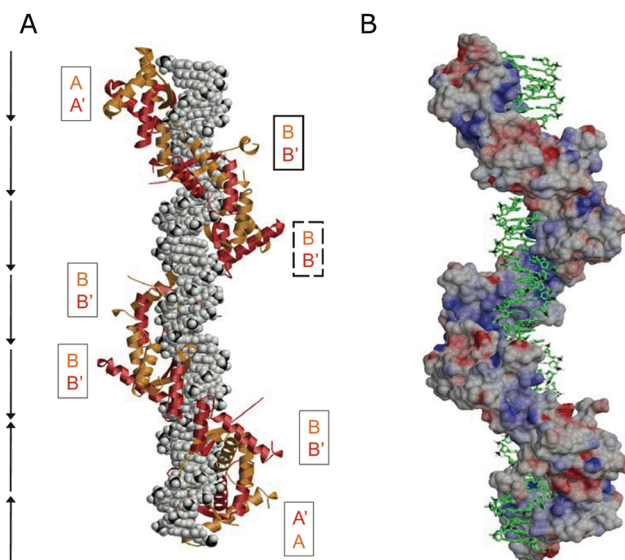


Figura 35. Modelo de ω_2 unida al ADN.

Modelo ω_2 unida al sitio *parS1* basado en las estructuras de $[\omega_2\Delta 19]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ y $[\omega_2\Delta 19]_2-(\rightarrow\leftarrow)$. En (A) el ADN se muestra como espacio lleno y la proteína ω_2 se representa como cintas naranjas y rojas. En (B) se muestra el potencial electrostático de la superficie de ω_2 . Las cargas positivas (azul) hacia el esqueleto de ADN.

El N-terminal de ω_2 no contribuye a la unión al ADN *in vitro* ni *in vivo* como se comentó previamente. En este trabajo se determinó que el N-terminal de la proteína ω_2 está involucrado en otro proceso que no es el de represión transcripcional, si no, como componente de un sistema de partición activa del plásmido del cual es regulador global.

Las proteínas δ_2 y ω_2 , junto con *parS* componen un sistema de partición activa

Los sistemas de partición activa están ampliamente distribuidos en plásmidos de bajo número de copias. Por comparación de secuencias, la proteína δ_2 , codificada en la región SegB del plásmido, era la candidata a ser parte de uno de estos sistemas como la ATPasa involucrada en estos procesos.

Faltaba identificar al segundo componente del sistema, y elegimos a la proteína ω_2 por sus características como proteína de unión al ADN, la similitud que tienen los sitios consenso de unión con probable sitios centroméricos, y porque es la proteína que regula la expresión de δ_2 .

Se obtuvo el cristal de la proteína δ_2 en complejo con ATP γ S. La proteína es un dímero en el cristal y los ensayos bioquímicos lo confirmaron. La proteína δ_2 es un homólogo estructural proteínas pertenecientes a la familia de ATPasas ParA/MinD: Soj, MinD (relacionadas con partición y división celular) y NifH, ArsA y otras proteínas no relacionadas con segregación. Las proteínas MinD y Soj se diferencian de δ_2 notablemente en que son dímeros solo cuando unen ATP (Cordell y Lowe, 2001) (Leonard y col., 2005) mientras que la estructura de δ_2 le permite intercambiar el ATP por ADP sin disociar el dímero.

Análisis *in vivo*

En las condiciones de crecimiento ensayadas se pudo comprobar que las proteínas ω_2 y δ_2 , conjuntamente con al menos uno de los sitios de unión de ω_2 (*parS*), incrementan la estabilidad segregacional de un plásmido inestable. Para esta función, se requiere hidrólisis de ATP por parte de δ_2 , la unión de ω_2 al ADN y el extremo N-terminal de ω_2 . Las variantes $\omega_2\Delta 19$, ω_2T29A o δ_2K36A , son incapaces de mantener al plásmido inestable cuando reemplazan a ω_2 o a δ_2 , respectivamente.

Con el objetivo de entender el mecanismo utilizado por δ_2 y ω_2 para estabilizar a un plásmido, el gen δ se fusionó al gen *gfp*, para permitirnos localizar a la proteína de fusión. No se pudo construir una fusión con el gen ω , ya que a la temperatura de crecimiento de las células, una variante de ω_2 con una fusión tanto en el extremo C o N-terminal, sería inestable (Misselwitz y col., 2001).

A nivel celular, la fusión de la proteína δ_2 a GFP muestra que, en ausencia de ω_2 , se encuentra asociada de manera estática al nucleóide de la célula, ya sea en *B. subtilis* o en *E. coli*. En cambio, cuando se encuentra presente ω_2 y ADN *parS*, la proteína δ_2 se relocaliza, concentrándose en uno de los nucleóides de células en división, o en los polos. Esta interacción requiere hidrólisis de ATP ya que la variante δ_2K36A fusionada a GFP puede verse distribuida por toda la célula, independientemente de la presencia de ω_2 . Un comportamiento similar se ha observado para la proteína Soj de *B. subtilis* fusionada a GFP y para la variante equivalente a δ_2K36A , SojK16Q (Marston y Errington, 1999; Quisel y col., 1999). Este efecto promovido por ω_2 y ADN *parS*, desaparece cuando se reemplaza ω_2 por las

variantes $\omega_2\Delta 19$ o ω_2T29A . Dado que en los experimentos de estabilidad del plásmido, las variantes $\omega_2\Delta 19$ y ω_2T29A no conseguían estabilizar un plásmido, se puede relacionar ambas observaciones para concluir que la relocalización de δ_2 es un proceso importante y necesario para asegurar la segregación plasmídica. Es destacable que aunque se haya visto en otros sistemas comportamientos similares, nunca se había demostrado una relación entre los fenómenos observados y la posible función de los mismos.

En imágenes deconvolucionadas se puede ver que la proteína δ_2 , forma en la célula estructuras filamentosas, que se han observado previamente con la proteína ParA del plásmido pB171 (Ebersbach y Gerdes, 2001, 2004).

En *E. coli*, donde δ_2 se expresa constitutivamente, en presencia de ω_2 y el sitio *parS*, la fusión δ -GFP oscila de polo a polo, en un rango de minutos. Esta oscilación con el mismo patrón, fue descrita para Soj-GFP en presencia de Spo0J y los sitios *parS* (Marston y Errington, 1999; Quisel y col., 1999). Otra proteína perteneciente a la familia ParA, MinD, oscila en *E. coli* pero en cuestión de segundos (Raskin y de Boer, 1999). La oscilación de MinD es esencial para cumplir su función en la selección del sitio de división (Rothfield y col., 2005). Que la oscilación de δ -GFP sólo se observe cuando está presente el sistema completo, sugiere que este efecto es importante para la correcta segregación de los plásmidos.

Analisis *in vitro*

La caracterización bioquímica de δ_2 nos llevó a determinar que sus actividades están moduladas por ω_2 y por la estequiometría entre ambas.

La actividad ATPasa de δ_2 , necesaria para la correcta segregación de los plásmidos, es muy débil al igual que en los otros sistemas de partición descritos. La estructura de la proteína δ_2 nos permitió proponer que esta hidrólisis tan débil se debe a que hay una alineación “incorrecta” de las moléculas reactivas (Figura 34F).

La presencia de ω_2 y el sitio *parS* incrementan de 4 a 6 veces esta actividad, pero solo cuando la relación entre ω_2 y δ_2 es baja, hasta llegar a la relación equimolar. Un exceso de ω_2 no estimula la actividad ATPasa de δ_2 . El efecto de ω_2 sobre la actividad de la proteína δ_2 requiere del N-terminal de ω_2 y que tenga intacta su capacidad de unión al ADN. Un péptido con los 19 primeros residuos de ω_2 no ejerce ningún efecto sobre la actividad ATPasa de δ_2 (no mostrado), sin embargo se describió para las proteínas Soj y MinD, que su actividad ATPasa es estimulada por Spo0J y MinE respectivamente, y se postuló que esta estimulación

era a través de sus extremos N-terminal (Leonard y col., 2005). En el caso de Soj, se observó una muy modesta estimulación de su actividad ATPasa (<10%) cuando se añadía un polipéptido sintético con la secuencia N-terminal de Spo0J (Leonard y col., 2005).

La estimulación de la actividad de δ_2 también en presencia de ADN no específico (Figura 23A) parece sugerir que se necesita la unión de ω_2 al ADN para tener suficiente concentración local de la proteína ya que a altas concentraciones ω_2 se une al ADN no específico y en este punto es donde empieza a estimular la actividad de δ_2 .

La proteína δ_2 polimeriza sobre el ADN en presencia de ω_2 , el sitio *parS*, y ATP. Esta polimerización requiere la unión al ATP y una relación de concentraciones $\omega_2:\delta_2$ alta. La despolimerización esta asociada a la hidrólisis del nucleótido, ya que en presencia de ATP γ S, no se observa el desensamblado de los filamentos. La polimerización se observa solamente cuando ω_2 , y no las variantes $\omega_2\Delta 19$ o ω_2T29A , está presente. La proteína δ_2K36A que es incapaz de hidrolizar ATP, no forma filamentos.

Con los ensayos de precipitación parece haber una contradicción con lo anterior, ya que vemos que aún en ausencia de ω_2 (pero en presencia de ADN y ATP) la proteína δ_2 precipita, lo que indicaría la formación de agregados. Sabemos por ensayos de retraso en gel y ensayos de protección a DNasa I que δ_2 se une al ADN inespecíficamente y extensivamente. Estos complejos pueden ser de peso molecular suficiente como para precipitar, por lo tanto no descartamos que ω_2 (a altas concentraciones) este estabilizando el nucleofilamento de δ_2 y sea la causa de que lo podamos ver en las preparaciones de microscopía electrónica.

Soj también muestra esta capacidad de polimerizar sobre el ADN pero a diferencia de δ_2 no precisa de la proteína ParB del sistema (Spo0J) (Leonard y col., 2005). La propiedad de las proteínas de la familia ParA de formar filamentos ha sido ampliamente investigada. A diferencia de δ_2 y de Soj, las proteínas SopA, ParA del plásmido pB171 y ParF forman filamentos independientemente de la presencia de ADN y de la proteína ParB (Barilla y col., 2005; Bouet y col., 2007; Ebersbach y col., 2006; Lim y col., 2005). La formación de filamentos de ParF y de SopA es modulada por la proteína de unión al centrómero (ParG y SopB, respectivamente) y en el caso de SopA, el ADN no solo no es necesario para la formación del filamento sino que inhibe su ensamblado.

También se ha observado para MinD, la formación de filamentos dependientes de la presencia de ATP, fosfolípidos y la proteína MinE. Curiosamente, MinE incrementa la formación de estos filamentos, y paradójicamente también causa su desensamblado. No se

conoce si estos efectos pueden ser separados de acuerdo a la concentración relativa de MinE respecto de MinD (Shih y Rothfield, 2006).

La estequiometría entre ParB y ParA del plásmido P1 determina si ParA es reclutada al complejo de partición o si ParA promueve el desensamblado de este complejo (Bouet y Funnell, 1999).

La polimerización de las proteínas sugiere que el mecanismo de acción de estos sistemas sea a través de “tirar” o “empujar” a los plásmidos. Pero en el caso de δ_2 que polimeriza sobre el ADN, no resulta tan obvio.

Formación de estructuras apareadas

Un aspecto de la segregación de plásmidos que permanece sin aclararse es si el apareamiento de plásmidos es un paso necesario para la posterior segregación y si en efecto existe. Las evidencias presentadas hasta ahora son indirectas para el plásmido P1 (del tipo I) (Edgar y col., 2001). En el caso del plásmido R1, donde el mecanismo de segregación es via ParM (que es similar a la actina), hay imágenes de microscopía electrónica en donde los plásmidos están apareados a través del complejo ParR/*parC* pero independientemente de ParM (Jensen y col., 1998). Estos resultados permiten proponer que mecanismos distintos tienen en común el apareamiento de los plásmidos antes de segregarlos a las células hijas. Nosotros realizamos experimentos para probar esta hipótesis y además analizar si la estequiometría entre ambas proteínas podían afectar el apareamiento.

En el sistema formado por δ_2 , ω_2 y *parS*, cuando ω_2 esta en baja concentración respecto a la de δ_2 , se observaron por microscopía electrónica estructuras de plásmidos apareados a través de la región de unión de ω_2 al ADN (*parS*). Un aumento en la concentración de ω_2 o el reemplazo de ω_2 por las variantes $\omega_2\Delta 19$ o ω_2T29A , o el de δ_2 por δ_2K36A , elimina la formación de este tipo de estructuras. Este delicado balance entre las concentraciones de ambas proteínas podría explicar porque su detección no es más generalizada.

Al realizar los ensayos de retraso en gel y de protección a DNasaI de los complejos de δ_2 y ω_2 con el ADN, nos encontramos con una situación contradictoria. En un gel no desnaturalizante en presencia de δ_2 y ω_2 se forman complejos de baja movilidad que sugieren que las dos proteínas están unidas al ADN. Sin embargo al estudiar estos complejos por ensayos de protección a DNasa I, se observa que sólo esta presente la huella de ω_2 (Figura

25). La observación de los plásmidos por microscopía electrónica reveló la formación de estructuras apareadas (Figura 30D). Esto explicaría los resultados obtenidos en los ensayos de interacción con el ADN. Si los fragmentos de ADN de 423 pb que utilizamos en estos ensayos estuvieran unidos entre sí a través del complejo $\delta_2 \cdot \omega_2 \cdot parS$, los complejos serían suficientemente grandes como para tener baja movilidad en geles no desnaturizantes y en los ensayos de protección a DNasa I sólo se vería la protección en el sitio de unión de ω_2 , que es por donde contactaría con el ADN el complejo $\delta_2 \cdot \omega_2$, sugiriendo interacción proteína-proteína dependiente de ATP.

Esta hipótesis se ve reforzada por la observación de que la variante $\omega_2 \Delta 19$ (que se une al ADN igual que la proteína silvestre), no promueve la formación de plásmidos apareados y en los ensayos de interacción con ADN con δ_2 y $\omega_2 \Delta 19$ muestran que ambas proteínas ocupan el ADN y a mayores concentraciones $\omega_2 \Delta 19$ termina desplazando a δ_2 del fragmento de 423 pb utilizado (Figura 25). Por microscopía electrónica se ve que ambas proteínas interaccionan con el ADN del plásmido 3,1 kb, $\omega_2 \Delta 19$ en la región *parS* y δ_2 en cualquier otro sitio de la molécula. (Figura 31C)

Modelos del mecanismo de acción de los sistemas de partición activa

De los sistemas de partición activa descritos hasta el momento destaca el del plásmido R1 de *E. coli* formado por ParM/ParR/*parC*. Este sistema está dentro de los de tipo II, es decir, ParM es una proteína similar a la actina. Como se comentó en la Introducción de este trabajo, ParM polimeriza por sí misma sin necesidad de ParR o *parC* y se estima que la concentración intracelular de ParM sería más que la necesaria para formar filamentos espontáneamente (Garner y col., 2004) que serían inestables. De esto y otros resultados surge un modelo: los filamentos de ParM polimerizan y despolimerizan caóticamente (Garner y col., 2004) y se estabilizarían al encontrar un par de plásmidos apareados por medio del complejo ParR/*parC*. Una vez que se capturaron los plásmidos, se insertan monómeros de ParM en la zona de interacción ParR/ParM y el filamento iría creciendo entre los plásmidos, alejándolos uno del otro (Ebersbach y Gerdes, 2005; Garner y col., 2004; Garner y col., 2007; Moller-Jensen y col., 2003).

El mecanismo de acción de los sistemas de partición tipo I, a pesar de toda la información disponible, es todavía poco claro. No hay un modelo que sea consistente con toda la

información que se posee, pero podría, en términos generales, no ser tan diferente a lo propuesto para los sistemas tipo II. En analogía con estos sistemas se ha propuesto que la proteína ParA polimeriza entre dos plásmidos y los empujando. Se describió para SopA la formación *in vitro* de filamentos astrales que se proyectan desde el ADN (Lim y col., 2005). En el sistema de pB171, donde se ve oscilación de ParA, se describió que los plásmidos están distribuidos regularmente a lo largo del eje mayor de la célula (Ebersbach y col., 2006). Por estas observaciones se propone que en un determinado momento la concentración de ParA es mayor entre dos de los plásmidos y los va empujando, luego, la mayor concentración de ParA esta entre otros dos plásmidos (lo que explicaría la oscilación) y los empuja. De esta manera gracias a la oscilación de ParA por la célula se irían manteniendo los plásmidos a lo largo de toda la célula y equidistantes entre sí (Ebersbach y col., 2006). Para probar este modelo habría que elucidar los mecanismos moleculares de la oscilación de la proteína ParA y como se ve influenciada por los otros componentes del sistema de partición.

Los datos que obtuvimos en este trabajo no encajan en estas propuestas completamente, por lo tanto para explicar nuestros resultados proponemos otro mecanismo de acción.

Dependiendo de la concentración relativa ω_2 tiene varias funciones: a baja relación molar $\omega_2:\delta_2$, estimula la actividad ATPasa de δ_2 , promueve la formación de plásmidos apareados en presencia de δ_2 . En estas mismas condiciones, δ_2 aumenta la afinidad de ω_2 por el ADN. Cuando ω_2 está presente en altas concentraciones, y siempre en presencia de ATP, ω_2 estimula o estabiliza la formación de nucleofilamentos de δ_2 , no aumenta la actividad ATPasa de δ_2 y ejerce un efecto negativo en la formación de los plásmidos apareados.

Para todas estas actividades se requiere que ω_2 se una al ADN y ejercería su efecto a través de una interacción proteína-proteína ya que se requiere el N-terminal de ω_2 , el cual se demostró previamente que no es necesario para la unión al ADN ni cambia la conformación de la proteína.

La proteína ω_2 se uniría a los sitios *parS* de los plásmidos replicados envolviendo al ADN (Figura 35). En estas condiciones reguladas (ω_2 regula su propia expresión y la de δ_2) ω_2 unida al ADN reclutaría a δ_2 para aparear dos moléculas de ADN.

El promotor de δ_2 es 5 veces más fuerte que el promotor de ω_2 y la afinidad de ω_2 por las secuencias promotoras es casi la misma (de la Hoz y col., 2000), esto indica que una pequeña variación en la concentración de ω_2 que libere la represión sobre los promotores resultaría en un cambio de las concentraciones relativas de ω_2 y δ_2 . La corrección de la estequiometría,

llevaría a un aumento de la concentración local de ω_2 y por lo tanto se rompería el apareamiento y δ_2 se redireccionaría polimerizando sobre el ADN plasmídico. Este filamento debería tener polaridad, como se infiere de la estructura del cristal de δ_2 . En ese momento la concentración local de ω_2 en un extremo del filamento es baja, la actividad ATPasa de δ_2 estaría estimulada y la hidrólisis de ATP haría que δ_2 se soltara del ADN. Al interaccionar ω_2 con la siguiente δ_2 unida al ADN se repetiría esta acción e iría provocando la despolimerización de δ_2 . Así, ω_2 (y el ADN al cual está unido) iría “moviéndose” detrás de δ_2 , de la misma manera que MinE va “quitando” a MinD de la membrana (Shih y Rothfield, 2006). Otra molécula de δ_2 se uniría al ADN por el otro extremo, generándose un ciclo de polimerización-despolimerización (Figura 36A y B).

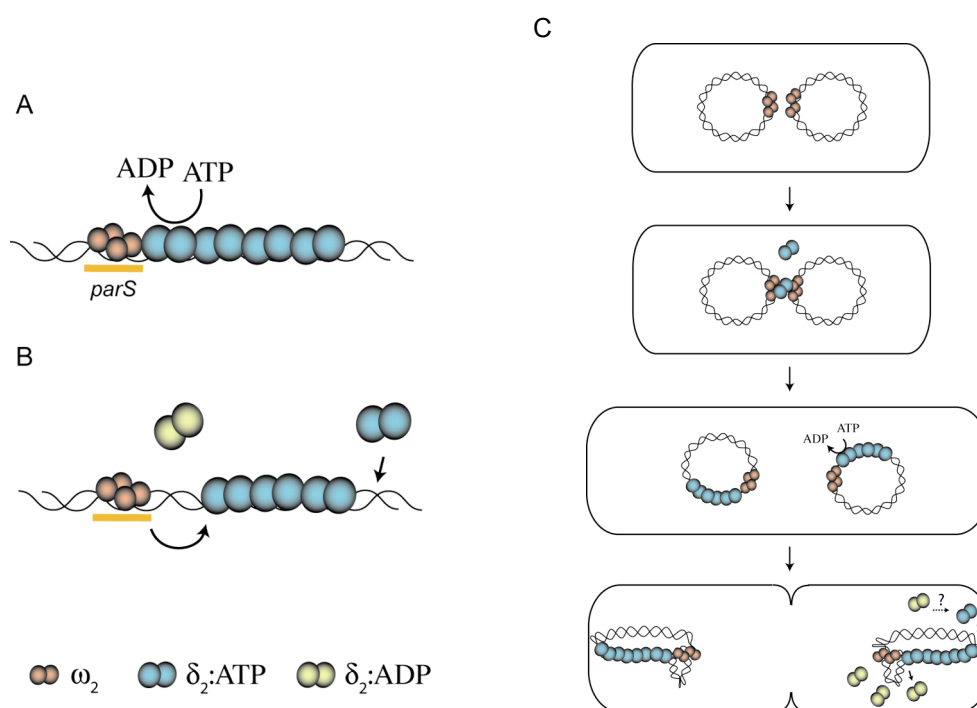


Figura 36. Modelo del mecanismo de acción del sistema de partición activa del plásmido pSM19035

Las esferas azules representan a la proteína δ_2 en su forma unida a ATP y las amarillas en su forma unida a ADP. Las esferas naranjas representan a la proteína ω_2 . En la parte A y B se muestra el posible mecanismo de polimerización y despolimerización de δ_2 promovido por ω_2 . En la parte C, se pone en contexto en el interior de una célula. El rectángulo representa una célula bacteriana, el círculo sería el ADNcd plasmídico.

Para que este modelo tenga validez es preciso que la polimerización de δ_2 tenga polaridad. Este ciclo de polimerización-despolimerización podría ser lo que visualizamos como oscilación en las fusiones con GFP. Otro punto interesante es que el nucleofilamento que

observamos por microscopía electrónica parece ser rígido, por lo que sería más fácil que el movimiento de ω_2 “persiguiendo” a δ_2 tuviera direccionalidad (Figura 36C)

Con los datos que manejamos, no se puede excluir la necesidad de una proteína celular para el correcto posicionamiento de los plásmidos, ya que si el filamento estuviera fijado a los polos o algún elemento del citoesqueleto, el movimiento del plásmido sería fácilmente explicable por ese mecanismo.

Se requiere todavía mucho trabajo para poder elucidar los mecanismos de los sistemas de partición. En los últimos años se han descrito varias proteínas que están organizadas en estructuras en la célula y parece indicar que existe un citoesqueleto en las bacterias más complejo que lo esperado (Shih y Rothfield, 2006).

El sistema de partición analizado en esta tesis es, además de ser el primero descrito en bacterias Gram-positivas, el único del cual se posee información bioquímica y estructural de las dos proteínas que componen el sistema, además de datos *in vivo*. Esperamos que en un futuro cercano la integración de estos conocimientos con datos adicionales nos permita explicar el mecanismo de segregación de ADN y poder extrapolarlo a sistemas más complejos.

∴ CONCLUSIONES ∴

Las conclusiones que se extrajeron de este trabajo son las siguientes:

1. La proteína ω_2 se une al ADN cooperativamente y con alta afinidad a través de una secuencia conteniendo repeticiones de 7 pares de bases (5' WATCACW 3') no espaciadas tanto en orientación directa como inversa. El sitio mínimo de unión son dos repeticiones sin espaciar, definiéndose cada heptámero como un subsitio de unión. El complejo mínimo ω_2 •ADN es un tetrámero de la proteína ω_2 unido a dos repeticiones directas o inversas en forma convergente.
2. La proteína ω_2 se une a dos repeticiones de forma directa ($\rightarrow\rightarrow$) o invertida convergente ($\rightarrow\leftarrow$) con afinidad similar, pero esta afinidad cae 6 veces si la orientación es divergente ($\leftarrow\rightarrow$). Con cuatro repeticiones se alcanzan valores de constante de disociación similares a las obtenidas con el operador silvestre (7 a 9 repeticiones no espaciadas).
3. La proteína ω_2 reconoce selectivamente los nucleótidos de la zona central de la repetición 5'-ATCAC-3'. Mutaciones en estas bases disminuyen la afinidad de la proteína ω_2 por el ADN. La proteína ω_2 interacciona directamente con el ADN a través de las bases 5'-AT-3' en una de las cadenas y con las bases 5'-GTG-3' en la otra. Este patrón de interacción se mantiene independientemente de la orientación de las repeticiones.
4. El extremo N-terminal de la proteína ω_2 hasta el residuo 19 no está implicado en la unión al ADN ni en el mecanismo de represión transcripcional. La ausencia del N-terminal no afecta la conformación de la región central de la proteína. Además del residuo Arg en la posición 31, el residuo treonina en la posición 29 de la secuencia de aminoácidos de ω_2 es esencial para el reconocimiento específico y de alta afinidad del ADN consenso y por lo tanto para su función como represor transcripcional. La variante ω_2 T29A no presenta cambios conformacionales respecto a la proteína silvestre.
5. La estructura de ω_2 en complejo con ADN compuesto por dos repeticiones directas o inversas, confirmó los datos obtenidos por ensayos bioquímicos. La proteína ω_2 se une de manera asimétrica a secuencias palindrómicas y no palindrómicas, siendo la interfaz dímero-dímero comparable en ambos casos y permitiendo así la unión cooperativa de la proteína.
6. La proteína δ_2 del plásmido pSM19035 junto con la proteína ω_2 y cualquiera de los seis sitios de unión de ω_2 , funcionan como un sistema de partición activa, el primero descrito para bacterias Gram-Positivas.
7. La proteína δ_2 , que es un dímero en solución independientemente de la presencia de nucleótido, pertenece a la superfamilia MinD/ParA. Se resolvió la estructura y ésta presenta similitud y diferencias con las estructuras de las proteínas Soj y MinD.
8. La actividad bioquímica de la proteína δ_2 es modulada por la proteína ω_2 y la estequiometría entre ambas: a baja relación ω_2 : δ_2 , la proteína ω_2 estimula la débil actividad ATPasa de δ_2 y promueve la formación de plásmidos apareados. En cambio a alta relación ω_2 : δ_2 , estimula o estabiliza la formación de nucleofilamentos por parte de la proteína δ_2 . Todas estas actividades fueron descritas en presencia de ATP y de

ADN con la secuencia *parS*. Además, independientemente de ω_2 , la proteína δ_2 se une al ADN inespecíficamente.

9. La proteína δ_2 fusionada a GFP se asocia estáticamente con el nucleoide de la célula pero en presencia de la región *parS* y la proteína ω_2 presenta un comportamiento dinámico. Se observa oscilación de la proteína de nucleoide a nucleoide y hacia los polos y la formación de estructuras tipo hélice.
10. Para que el sistema de partición activa funcione correctamente *in vivo* se requiere: (i) la presencia del N-terminal de ω_2 y de su capacidad de unirse al ADN *parS* con alta afinidad y especificidad y (ii) la actividad ATPasa de la proteína δ_2 . Lo mismo se requiere para observar *in vitro* la modulación de la actividad de δ_2 por ω_2 .

∴ BIBLIOGRAFÍA ∴

- Alonso, J.C., Ayora, S., Canosa, I., Weise, F., and Rojo, F. (1996) Site-specific recombination in gram-positive theta-replicating plasmids. *FEMS Microbiol Lett* **142**: 1-10.
- Autret, S., Nair, R., and Errington, J. (2001) Genetic analysis of the chromosome segregation protein Spo0J of *Bacillus subtilis*: evidence for separate domains involved in DNA binding and interactions with Soj protein. *Mol Microbiol* **41**: 743-755.
- Barilla, D., Rosenberg, M.F., Nobbmann, U., and Hayes, F. (2005) Bacterial DNA segregation dynamics mediated by the polymerizing protein ParF. *EMBO J* **24**: 1453-1464.
- Biek, D.P., and Shi, J. (1994) A single 43-bp sopC repeat of plasmid mini-F is sufficient to allow assembly of a functional nucleoprotein partition complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8027-8031.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Blanco, A.G., Sola, M., Gomis-Ruth, F.X., and Coll, M. (2002) Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure (Camb)* **10**: 701-713.
- Bott, K.F., and Wilson, G.A. (1968) Metabolic and nutritional factors influencing the development of competence for transfection of *Bacillus subtilis*. *Bacteriol Rev* **32**: 370-378.
- Bouet, J.Y., and Funnell, B.E. (1999) P1 ParA interacts with the P1 partition complex at parS and an ATP-ADP switch controls ParA activities. *Embo J* **18**: 1415-1424.
- Bouet, J.Y., Ah-Seng, Y., Benmeradi, N., and Lane, D. (2007) Polymerization of SopA partition ATPase: regulation by DNA binding and SopB. *Mol Microbiol* **63**: 468-481.
- Brantl, S., Behnke, D., and Alonso, J.C. (1990) Molecular analysis of the replication region of the conjugative *Streptococcus agalactiae* plasmid pIP501 in *Bacillus subtilis*. Comparison with plasmids pAM beta 1 and pSM19035. *Nucleic Acids Res* **18**: 4783-4790.
- Brantl, S., and Wagner, E.G. (1997) Dual function of the copR gene product of plasmid pIP501. *J Bacteriol* **179**: 7016-7024.
- Brantl, S. (2007) Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *Curr Opin Microbiol*.
- Breuner, A., Jensen, R.B., Dam, M., Pedersen, S., and Gerdes, K. (1996) The centromere-like parC locus of plasmid R1. *Mol Microbiol* **20**: 581-592.
- Brown, B.M., Milla, M.E., Smith, T.L., and Sauer, R.T. (1994) Scanning mutagenesis of the Arc repressor as a functional probe of operator recognition. *Nat Struct Biol* **1**: 164-168.
- Camacho, A.G., Misselwitz, R., Behlke, J., Ayora, S., Welfle, K., Meinhart, A., Lara, B., Saenger, W., Welfle, H., and Alonso, J.C. (2002) In vitro and in vivo stability of the epsilon2zeta2 protein complex of the broad host-range *Streptococcus pyogenes* pSM19035 addiction system. *Biol Chem* **383**: 1701-1713.
- Canosa, I., Rojo, F., and Alonso, J.C. (1996) Site-specific recombination by the beta protein from the streptococcal plasmid pSM19035: minimal recombination sequences and crossing over site. *Nucleic Acids Res* **24**: 2712-2717.
- Canosa, I., Lurz, R., Rojo, F., and Alonso, J.C. (1998) beta Recombinase catalyzes inversion and resolution between two inversely oriented six sites on a supercoiled DNA substrate and only inversion on relaxed or linear substrates. *J Biol Chem* **273**: 13886-13891.
- Canosa, I., Lopez, G., Rojo, F., Boocock, M.R., and Alonso, J.C. (2003) Synapsis and strand exchange in the resolution and DNA inversion reactions catalysed by the beta recombinase. *Nucleic Acids Res* **31**: 1038-1044.
- Ceglowski, P., Boitsov, A., Chai, S., and Alonso, J.C. (1993a) Analysis of the stabilization system of pSM19035-derived plasmid pBT233 in *Bacillus subtilis*. *Gene* **136**: 1-12.

- Ceglowski, P., Boitsov, A., Karamyan, N., Chai, S., and Alonso, J.C. (1993b) Characterization of the effectors required for stable inheritance of *Streptococcus pyogenes* pSM19035-derived plasmids in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **241**: 579-585.
- Ciccarelli, F.D., Doerks, T., von Mering, C., Creevey, C.J., Snel, B., and Bork, P. (2006) Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* **311**: 1283-1287.
- Cordell, S.C., and Lowe, J. (2001) Crystal structure of the bacterial cell division regulator MinD. *FEBS Lett* **492**: 160-165.
- Davey, M.J., and Funnell, B.E. (1994) The P1 plasmid partition protein ParA. A role for ATP in site-specific DNA binding. *J Biol Chem* **269**: 29908-29913.
- Davis, M.A., Martin, K.A., and Austin, S.J. (1992) Biochemical activities of the parA partition protein of the P1 plasmid. *Mol Microbiol* **6**: 1141-1147.
- de la Hoz, A.B., Ayora, S., Sitkiewicz, I., Fernandez, S., Pankiewicz, R., Alonso, J.C., and Ceglowski, P. (2000) Plasmid copy-number control and better-than-random segregation genes of pSM19035 share a common regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 728-733.
- de la Hoz, A.B., Pratto, F., Misselwitz, R., Speck, C., Weihofen, W., Welfle, K., Saenger, W., Welfle, H., and Alonso, J.C. (2004) Recognition of DNA by omega protein from the broad-host range *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035: analysis of binding to operator DNA with one to four heptad repeats. *Nucleic Acids Res* **32**: 3136-3147.
- del Solar, G., and Espinosa, M. (2000) Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol Microbiol* **37**: 492-500.
- Dmowski, M., Sitkiewicz, I., and Ceglowski, P. (2006) Characterization of a novel partition system encoded by the delta and omega genes from the streptococcal plasmid pSM19035. *J Bacteriol* **188**: 4362-4372.
- Dostál, L., Misselwitz, R., Laettig, S., Alonso, J.C., and Welfle, H. (2003) Raman spectroscopy of regulatory protein Omega from *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035 and complexes with operator DNA. *Spectroscopy* **17**: 435-445.
- Ebersbach, G., and Gerdes, K. (2001) The double par locus of virulence factor pB171: DNA segregation is correlated with oscillation of ParA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 15078-15083.
- Ebersbach, G., and Gerdes, K. (2004) Bacterial mitosis: partitioning protein ParA oscillates in spiral-shaped structures and positions plasmids at mid-cell. *Mol Microbiol* **52**: 385-398.
- Ebersbach, G., and Gerdes, K. (2005) Plasmid segregation mechanisms. *Annu Rev Genet* **39**: 453-479.
- Ebersbach, G., Ringgaard, S., Moller-Jensen, J., Wang, Q., Sherratt, D.J., and Gerdes, K. (2006) Regular cellular distribution of plasmids by oscillating and filament-forming ParA ATPase of plasmid pB171. *Mol Microbiol*.
- Edgar, R., Chattoraj, D.K., and Yarmolinsky, M. (2001) Pairing of P1 plasmid partition sites by ParB. *Mol Microbiol* **42**: 1363-1370.
- Fung, E., Bouet, J.Y., and Funnell, B.E. (2001) Probing the ATP-binding site of P1 ParA: partition and repression have different requirements for ATP binding and hydrolysis. *Embo J* **20**: 4901-4911.
- Funnell, B.E. (1991) The P1 plasmid partition complex at parS. The influence of *Escherichia coli* integration host factor and of substrate topology. *J Biol Chem* **266**: 14328-14337.
- Funnell, B.E. (2005) Partition-mediated plasmid pairing. *Plasmid* **53**: 119-125.
- Garner, E.C., Campbell, C.S., and Mullins, R.D. (2004) Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog. *Science* **306**: 1021-1025.
- Garner, E.C., Campbell, C.S., Weibel, D.B., and Mullins, R.D. (2007) Reconstitution of DNA segregation driven by assembly of a prokaryotic actin homolog. *Science* **315**: 1270-1274.

- Gerdes, K., Moller-Jensen, J., and Bugge Jensen, R. (2000) Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol Microbiol* **37**: 455-466.
- Golovanov, A.P., Barilla, D., Golovanova, M., Hayes, F., and Lian, L.Y. (2003) ParG, a protein required for active partition of bacterial plasmids, has a dimeric ribbon-helix-helix structure. *Mol Microbiol* **50**: 1141-1153.
- Gomis-Ruth, F.X., Sola, M., Acebo, P., Parraga, A., Guasch, A., Eritja, R., Gonzalez, A., Espinosa, M., del Solar, G., and Coll, M. (1998) The structure of plasmid-encoded transcriptional repressor CopG unliganded and bound to its operator. *Embo J* **17**: 7404-7415.
- Gordon, S., Rech, J., Lane, D., and Wright, A. (2004) Kinetics of plasmid segregation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **51**: 461-469.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hayashi, I., Oyama, T., and Morikawa, K. (2001) Structural and functional studies of MinD ATPase: implications for the molecular recognition of the bacterial cell division apparatus. *Embo J* **20**: 1819-1828.
- Ireton, K., Gunther, N.W.t., and Grossman, A.D. (1994) spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**: 5320-5329.
- Jensen, R.B., Dam, M., and Gerdes, K. (1994) Partitioning of plasmid R1. The parA operon is autoregulated by ParR and its transcription is highly stimulated by a downstream activating element. *J Mol Biol* **236**: 1299-1309.
- Jensen, R.B., and Gerdes, K. (1997) Partitioning of plasmid R1. The ParM protein exhibits ATPase activity and interacts with the centromere-like ParR-parC complex. *J Mol Biol* **269**: 505-513.
- Jensen, R.B., Lurz, R., and Gerdes, K. (1998) Mechanism of DNA segregation in prokaryotes: replicon pairing by parC of plasmid R1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 8550-8555.
- Kalivoda, K.A., Steenbergen, S.M., Vimr, E.R., and Plumbbridge, J. (2003) Regulation of sialic acid catabolism by the DNA binding protein NanR in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**: 4806-4815.
- Koch, A.L. (2003) Were Gram-positive rods the first bacteria? *Trends Microbiol* **11**: 166-170.
- Koonin, E.V. (1993) A superfamily of ATPases with diverse functions containing either classical or deviant ATP-binding motif. *J Mol Biol* **229**: 1165-1174.
- Lee, P.S., Lin, D.C., Moriya, S., and Grossman, A.D. (2003) Effects of the chromosome partitioning protein Spo0J (ParB) on oriC positioning and replication initiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **185**: 1326-1337.
- Lee, P.S., and Grossman, A.D. (2006) The chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB) contribute to accurate chromosome partitioning, separation of replicated sister origins, and regulation of replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **60**: 853-869.
- Lemonnier, M., Bouet, J.Y., Libante, V., and Lane, D. (2000) Disruption of the F plasmid partition complex in vivo by partition protein SopA. *Mol Microbiol* **38**: 493-505.
- Leonard, T.A., Butler, P.J., and Lowe, J. (2005) Bacterial chromosome segregation: structure and DNA binding of the Soj dimer - a conserved biological switch. *EMBO J* **24**: 270-282.
- Lim, G.E., Derman, A.I., and Pogliano, J. (2005) Bacterial DNA segregation by dynamic SopA polymers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 17658-17663.
- Lin, D.C., and Grossman, A.D. (1998) Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site. *Cell* **92**: 675-685.

- Lioy, V.S., Martin, M.T., Camacho, A.G., Lurz, R., Antelmann, H., Hecker, M., Hitchin, E., Ridge, Y., Wells, J.M., and Alonso, J.C. (2006) pSM19035-encoded {zeta} toxin induces stasis followed by death in a subpopulation of cells. *Microbiology* **152**: 2365-2379.
- Lobocka, M., and Yarmolinsky, M. (1996) P1 plasmid partition: a mutational analysis of ParB. *J Mol Biol* **259**: 366-382.
- Lynch, A.S., and Wang, J.C. (1995) SopB protein-mediated silencing of genes linked to the sopC locus of Escherichia coli F plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1896-1900.
- Marston, A.L., and Errington, J. (1999) Dynamic movement of the ParA-like Soj protein of B. subtilis and its dual role in nucleoid organization and developmental regulation. *Mol Cell* **4**: 673-682.
- Meinhart, A., Alonso, J.C., Strater, N., and Saenger, W. (2003) Crystal structure of the plasmid maintenance system epsilon/zeta: functional mechanism of toxin zeta and inactivation by epsilon 2 zeta 2 complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1661-1666.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Misselwitz, R., de la Hoz, A.B., Ayora, S., Welfle, K., Behlke, J., Murayama, K., Saenger, W., Alonso, J.C., and Welfle, H. (2001) Stability and DNA-binding properties of the omega regulator protein from the broad-host range Streptococcus pyogenes plasmid pSM19035. *FEBS Lett* **505**: 436-440.
- Moller-Jensen, J., Jensen, R.B., Lowe, J., and Gerdes, K. (2002) Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. *Embo J* **21**: 3119-3127.
- Moller-Jensen, J., Borch, J., Dam, M., Jensen, R.B., Roepstorff, P., and Gerdes, K. (2003) Bacterial mitosis: ParM of plasmid R1 moves plasmid DNA by an actin-like insertional polymerization mechanism. *Mol Cell* **12**: 1477-1487.
- Mori, H., Kondo, A., Ohshima, A., Ogura, T., and Hiraga, S. (1986) Structure and function of the F plasmid genes essential for partitioning. *J Mol Biol* **192**: 1-15.
- Mori, H., Mori, Y., Ichinose, C., Niki, H., Ogura, T., Kato, A., and Hiraga, S. (1989) Purification and characterization of SopA and SopB proteins essential for F plasmid partitioning. *J Biol Chem* **264**: 15535-15541.
- Motallebi-Veshareh, M., Rouch, D.A., and Thomas, C.M. (1990) A family of ATPases involved in active partitioning of diverse bacterial plasmids. *Mol Microbiol* **4**: 1455-1463.
- Murayama, K., Orth, P., de la Hoz, A.B., Alonso, J.C., and Saenger, W. (2001) Crystal structure of omega transcriptional repressor encoded by Streptococcus pyogenes plasmid pSM19035 at 1.5 Å resolution. *J Mol Biol* **314**: 789-796.
- Naar, A.M., Boutin, J.M., Lipkin, S.M., Yu, V.C., Holloway, J.M., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1991) The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* **65**: 1267-1279.
- Nordstrom, K., and Austin, S.J. (1989) Mechanisms that contribute to the stable segregation of plasmids. *Annu Rev Genet* **23**: 37-69.
- Ogura, T., Niki, H., Mori, H., Morita, M., Hasegawa, M., Ichinose, C., and Hiraga, S. (1990) Identification and characterization of gyrB mutants of Escherichia coli that are defective in partitioning of mini-F plasmids. *J Bacteriol* **172**: 1562-1568.
- Ou, X.M., Storrington, J.M., Kushwaha, N., and Albert, P.R. (2001) Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT1A receptor gene. *J Biol Chem* **276**: 14299-14307.
- Phillips, S.E., Manfield, I., Parsons, I., Davidson, B.E., Rafferty, J.B., Somers, W.S., Margarita, D., Cohen, G.N., Saint-Girons, I., and Stockley, P.G. (1989) Cooperative tandem binding of met repressor of Escherichia coli. *Nature* **341**: 711-715.

- Pogliano, J., Ho, T.Q., Zhong, Z., and Helinski, D.R. (2001) Multicopy plasmids are clustered and localized in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4486-4491.
- Popescu, A., Karpay, A., Israel, D.A., Peek, R.M., Jr., and Krezel, A.M. (2005) *Helicobacter pylori* protein HP0222 belongs to Arc/MetJ family of transcriptional regulators. *Proteins* **59**: 303-311.
- Ptashne, M. (1986) *A genetic switch. Gene control and phage lambda*. Cambridge: Cell Press and Blackwell Scientific Publications.
- Quisel, J.D., Lin, D.C., and Grossman, A.D. (1999) Control of development by altered localization of a transcription factor in *B. subtilis*. *Mol Cell* **4**: 665-672.
- Quisel, J.D., and Grossman, A.D. (2000) Control of sporulation gene expression in *Bacillus subtilis* by the chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB). *J Bacteriol* **182**: 3446-3451.
- Raskin, D.M., and de Boer, P.A. (1999) Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4971-4976.
- Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R.M., and Sigler, P.B. (1995) Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* **375**: 203-211.
- Raumann, B.E., Rould, M.A., Pabo, C.O., and Sauer, R.T. (1994) DNA recognition by beta-sheets in the Arc repressor-operator crystal structure. *Nature* **367**: 754-757.
- Rhodes, D., and Klug, A. (1986) An underlying repeat in some transcriptional control sequences corresponding to half a double helical turn of DNA. *Cell* **46**: 123-132.
- Rodionov, O., Lobočka, M., and Yarmolinsky, M. (1999) Silencing of genes flanking the P1 plasmid centromere. *Science* **283**: 546-549.
- Rodionov, O., and Yarmolinsky, M. (2004) Plasmid partitioning and the spreading of P1 partition protein ParB. *Mol Microbiol* **52**: 1215-1223.
- Royo, F., and Alonso, J.C. (1994) A novel site-specific recombinase encoded by the *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035. *J Mol Biol* **238**: 159-172.
- Rothfield, L., Taghbalout, A., and Shih, Y.L. (2005) Spatial control of bacterial division-site placement. *Nat Rev Microbiol* **3**: 959-968.
- Sakai, N., Itou, H., Watanabe, N., Yao, M., and Tanaka, I. (2001) The MinD protein from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*: crystallization and preliminary X-ray analysis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**: 896-897.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989a) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989b) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sander, C., and Schneider, R. (1991) Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins* **9**: 56-68.
- Schildbach, J.F., Karzai, A.W., Raumann, B.E., and Sauer, R.T. (1999) Origins of DNA-binding specificity: role of protein contacts with the DNA backbone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 811-817.
- Schindelin, H., Kisker, C., Schlessman, J.L., Howard, J.B., and Rees, D.C. (1997) Structure of ADP x AIF4(-)-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. *Nature* **387**: 370-376.
- Schreiter, E.R., Sintchak, M.D., Guo, Y., Chivers, P.T., Sauer, R.T., and Drennan, C.L. (2003) Crystal structure of the nickel-responsive transcription factor NikR. *Nat Struct Biol* **10**: 794-799.

- Schumacher, M.A., and Funnell, B.E. (2005) Structures of ParB bound to DNA reveal mechanism of partition complex formation. *Nature* **438**: 516-519.
- Schwarz, F.V., Perreten, V., and Teuber, M. (2001) Sequence of the 50-kb conjugative multiresistance plasmid pRE25 from *Enterococcus faecalis* RE25. *Plasmid* **46**: 170-187.
- Shih, Y.L., and Rothfield, L. (2006) The bacterial cytoskeleton. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 729-754.
- Smith, T.L., and Sauer, R.T. (1995) P22 Arc repressor: role of cooperativity in repression and binding to operators with altered half-site spacing. *J Mol Biol* **249**: 729-742.
- Smith, T.L., and Sauer, R.T. (1996) Role of operator subsites in Arc repression. *J Mol Biol* **264**: 233-242.
- Somers, W.S., and Phillips, S.E. (1992) Crystal structure of the met repressor-operator complex at 2.8 Å resolution reveals DNA recognition by beta-strands. *Nature* **359**: 387-393.
- Suefuji, K., Valluzzi, R., and RayChaudhuri, D. (2002) Dynamic assembly of MinD into filament bundles modulated by ATP, phospholipids, and MinE. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16776-16781.
- Tullius, T.D., and Dombroski, B.A. (1986) Hydroxyl radical "footprinting": high-resolution information about DNA-protein contacts and application to lambda repressor and Cro protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 5469-5473.
- Uegaki, K., Shirakawa, M., Fujita, T., Taniguchi, T., and Kyogoku, Y. (1993) Characterization of the DNA binding domain of the mouse IRF-2 protein. *Protein Eng* **6**: 195-200.
- Umesono, K., Murakami, K.K., Thompson, C.C., and Evans, R.M. (1991) Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* **65**: 1255-1266.
- van den Ent, F., Moller-Jensen, J., Amos, L.A., Gerdes, K., and Lowe, J. (2002) F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *Embo J* **21**: 6935-6943.
- Watanabe, E., Inamoto, S., Lee, M.H., Kim, S.U., Ogua, T., Mori, H., Hiraga, S., Yamasaki, M., and Nagai, K. (1989) Purification and characterization of the sopB gene product which is responsible for stable maintenance of mini-F plasmid. *Mol Gen Genet* **218**: 431-436.
- Watanabe, E., Wachi, M., Yamasaki, M., and Nagai, K. (1992) ATPase activity of SopA, a protein essential for active partitioning of F plasmid. *Mol Gen Genet* **234**: 346-352.
- Weihofen, W.A., Cicek, A., Pratto, F., Alonso, J.C., and Saenger, W. (2006) Structures of omega repressors bound to direct and inverted DNA repeats explain modulation of transcription. *Nucleic Acids Res* **34**: 1450-1458.
- Weitao, T., Dasgupta, S., and Nordstrom, K. (2000) Plasmid R1 is present as clusters in the cells of *Escherichia coli*. *Plasmid* **43**: 200-204.
- Welfle, K., Pratto, F., Misselwitz, R., Behlke, J., Alonso, J.C., and Welfle, H. (2005) Role of the N-terminal region and of beta-sheet residue Thr29 on the activity of the omega2 global regulator from the broad-host range *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035. *Biol Chem* **386**: 881-894.
- Xiao, H., Perisic, O., and Lis, J.T. (1991) Cooperative binding of *Drosophila* heat shock factor to arrays of a conserved 5 bp unit. *Cell* **64**: 585-593.
- Xu, X., Sun, Y.L., and Hoey, T. (1996) Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* **273**: 794-797.
- Yamaichi, Y., and Niki, H. (2000) Active segregation by the *Bacillus subtilis* partitioning system in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 14656-14661.

∴ ANEXO ∴

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

de la Hoz, A.B., **Pratto, F.**, Misselwitz, R., Speck, C., Weihofen, W., Welfle, K., Saenger, W., Welfle, H. y Alonso, J.C. (2004) The Regulatory Protein ω_2 from the Broad-Host Range *Streptococcus pyogenes* Plasmid pSM19035: Analysis of Binding to Operator DNA with one to four Heptad Repeats. *Nucl. Acids Res.* 32, 3136-3147

Welfle, K., **Pratto, F.**, Misselwitz, R., Behlke, J., Alonso J.C. y Welfle, H. (2005) Role of the N-terminal region and of β -sheet residue Thr29 on the activity of ω_2 global regulator from the broad-host range *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035. *Biol. Chem.* 386, 881-894

Weihofen, W., Cicek, A., **Pratto, F.**, Alonso, J.C. y Saenger, W. (2006) Structures of ω repressors bound to direct and inverted DNA repeats explain modulation of transcription. *Nucl. Acids. Res.* 34, 1450-1058

Dostál L., **Pratto, F.**, Alonso, J.C. y Welfle, H. (2007) Binding of regulatory protein Omega from *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035 to direct and inverse 7-base pair repeats of operator DNA. *J. Raman. Streptosc.* 38, 166-175

Trabajos enviado a publicar y en preparación:

Pratto, F., Cicek, A., Weihofen, W.A., Lurz, R., Alonso, J.C., Saenger, W. (2007) Structure of Partition Protein δ and its Function in the Faithful Segregation of Plasmid pSM19035. Enviado a publicar

Welfle, K., **Pratto, F.**, Misselwitz, R., Alonso J.C. y Welfle, H. (2007) The DNA binding mode of the ω_2 global regulator from the broad-host range *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035. En preparación

Recognition of DNA by ω protein from the broad-host range *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035: analysis of binding to operator DNA with one to four heptad repeats

Ana B. de la Hoz, Florencia Pratto, Rolf Misselwitz¹, Christian Speck², Wilhelm Weihofen³, Karin Welfle¹, Wolfram Saenger³, Heinz Welfle¹ and Juan C. Alonso*

Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, 28049 Madrid, Spain, ¹Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, 13092 Berlin, Germany, ²Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, 14195 Berlin, Germany and ³Institut für Kristallographie, Freie Universität Berlin, 14195 Berlin, Germany

Received February 19, 2004; Revised April 28, 2004; Accepted May 13, 2004

ABSTRACT

pSM19035-encoded ω protein forms a dimer (ω_2) that binds to a set of 7-bp repeats with sequence 5'-NATCACN-3'. Upon binding to its cognate sites, ω_2 regulates transcription of genes required for copy number control and stable inheritance of plasmids, and promotes accurate plasmid segregation. Protein ω_2 binds poorly to one heptad but the affinity to DNA increases with two and more unspaced heptads in direct or inverted orientation. DNA titration of increasing numbers of heptads with ω_2 , monitored by circular dichroism measurements, indicates the binding of one ω_2 to one heptad (ω_2 :heptad stoichiometry of 1:1). Spacing of two directly or inversely oriented heptads by 1 to 7 bp reduces the affinity of the protein for its cognate target site. The binding affinity of ω_2 for two directly repeated heptads was severely reduced if one of the base pairs of the core 5'-ATCAC-3' sequence of one of the heptads was individually substituted by any other base pair. Hydroxyl radical footprinting shows a protection pattern at the 5'-ATCAC-3' core. These data suggest that each heptad defines an operator half-site and that tight binding of the symmetric ω_2 to the central 5'-TCA-3' core of symmetric or asymmetric targets (differently oriented heptads) is probably achieved by structural changes of DNA and/or protein or both.

INTRODUCTION

Gene regulation in prokaryotes is achieved largely by proteins, having predominantly helix–turn–helix (HTH) DNA binding motifs, and interacting specifically with palindromic DNA sequences to repress or activate expression of associated genes

or groups of genes (1). Recognition of arrays of short direct DNA repeats by specific transcriptional regulators is rare in bacteria (2–5). The ribbon–helix–helix (RHH) or $(\beta\alpha\alpha)_2$ proteins are a growing family of DNA binding proteins, of which many have been studied by X-ray crystallography and NMR spectroscopy (6–12). Among the characteristics associated with the DNA-binding domain of $(\beta\alpha\alpha)_2$ proteins are two-stranded antiparallel β -sheets that make sequence-specific contacts with the major groove of DNA, and several residues of the second α -helix (α_B) interact with phosphates of the DNA backbone. Most RHH proteins, which are symmetric dimers, bind as tetramers, or higher order oligomers, to operator sequences containing two or more binding sites that are usually arranged as inverted (Arc, CopG) or direct (MetJ) repeats for each dimeric DNA-binding protein domain (6,7,9). The MetJ interacts symmetrically with its directly repeated cognate site, whereas the Arc and CopG proteins interact asymmetrically with their palindromic targets (6,7,9).

The *Streptococcus pyogenes* pSM19035-encoded ω_2 protein, which belongs to a family of RHH DNA-binding proteins, binds to upstream promoter regions of genes involved in copy number control (*PcopS*), partition (*P δ /parS*) and partition and post-segregational killing (*P ω*) (2,13,14). The ω_2 protein target site consists of two (*P ω*) or three (*PcopS*) copies of a block composed of two direct and one inverted 7-bp repeats (5'-^A/TATCAC^A/T-3') symbolized by $\longrightarrow\longrightarrow\longleftarrow$, plus one additional 7-bp direct repeat \longrightarrow downstream of the last block in *Pcop*, or in the inverted \longleftarrow orientation downstream of the last block in *P ω* (see Fig. 1). Upstream of *P δ* , which overlaps with the *parS* site, there are seven head-to-tail direct 7-bp repeats and two inverted 7-bp repeats (Fig. 1). Such organization of binding sites has been well documented for eukaryotic transcription factors that bind cooperatively to tandemly repeated units [e.g., TFIIA (15), STAT family of proteins (16), HSF protein (17), IRF family of proteins (18), MR-GR proteins (19), NR superfamily of proteins (TRE, VDR, RAR, RXR) (20–22)]. Here the relative

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 585 4546; Fax: +34 585 4506; Email: jcalonso@cnb.uam.es

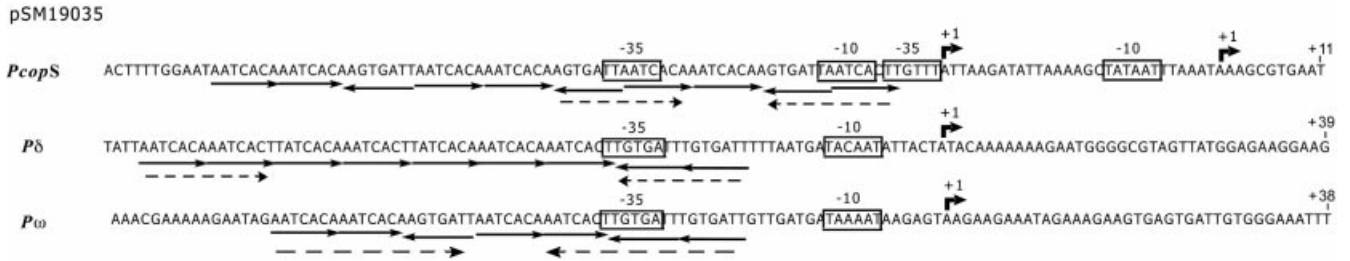


Figure 1. Comparison of the nucleotide sequences of the ω_2 targets. The conserved -35 and -10 regions of the *P*cops, *P* δ and *P* ω promoters are indicated as full line boxes. Bent arrows and $+1$ denotes known transcription start sites. The ω_2 protein binding 7 bp repeats and their relative orientations are indicated by arrows below the nucleotide sequences. Putative palindromic sequences are indicated by dashed convergent arrows below the nucleotide sequences.

orientation and spacing of the core recognition motifs play an essential role in the specificity of DNA-binding and transcriptional activation.

Using site-directed mutagenesis, electrophoretic mobility shift assay (EMSA), DNase I and hydroxyl radical footprinting, surface plasmon resonance (SPR), and spectroscopic studies we have examined the binding of ω_2 to various arrays of the 7-bp repeat. These experiments show that ω_2 binds with very low affinity and no specificity to a single 7-bp repeat. The binding of ω_2 to DNA, albeit with varying individual affinity, is achieved by units composed of two differently oriented repeats [(\longrightarrow)₂], ($\longrightarrow\longleftarrow$) and ($\longleftarrow\longrightarrow$)]. The inverted repeats ($\longrightarrow\longleftarrow$) and ($\longleftarrow\longrightarrow$) are palindromic as the sequences are related by a 2-fold rotation axis, whereas the directed repeats (\longrightarrow)₂ are not. Clusters of three, four or more (as well as the full-length cognate recognition sites composed of up to 10 heptads) provide the highest stability to the ω_2 -DNA complexes with dissociation constants in the 5 nM range (2). Circular dichroism (CD) studies indicate that ω_2 induces local conformational changes in DNA.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids and oligonucleotides

Escherichia coli BL21(DE3) and XL1-Blue strains, the *Bacillus subtilis* P δ :lacZ, recA4 strain and plasmids pUC18, pHP13- ω and pT712 ω were previously described (2,23,24). pHP14-borne ω (pHP14- ω) and $\omega\Delta 19$ gene (pHP14- $\omega\Delta 19$) were used for β -galactosidase measurements. Oligonucleotides containing the specified number of heptads were synthesized with three flanking adenines (aaa) at the 5'-end and three guanines (ggg) at the 3'-end [denoted in lower case letters, e.g., 5'-aaaAATCACAggg-3' (symbolized \longrightarrow) or 5'-aaaTGTGATTggg-3' (\longleftarrow)]. These oligonucleotides and their complementary strands were annealed, gel purified and joined to HindII-cleaved pUC18 DNA. The ligated material was transformed into XL1-Blue competent cells. The modified plasmids contain two heptads [pCB252 (5'-aaaAATCACAAATCACAggg-3', \longrightarrow_2), pBC520 (5'-aaaTGTGATTAATCACAggg-3', \longleftarrow_2) and pCB474 (5'-aaaAATCACATGTGATTggg-3', \longrightarrow_2)], three heptads [pCB343 (5'-aaaAATCACAAATCACAAATCACAggg-3', \longrightarrow_3), pCB251 (5'-aaaAATCACAAATCACATGTGATTggg-3', $\longrightarrow_2\longleftarrow_2$)], and four heptads

[pCB345 (5'-aaaAATCACAATCACAATCACAATCACAATCACAagg-3', \longrightarrow_4), pCB344 (5'-aaaAATCACAATCACAATGTGATTTGTGATTggg-3', $\longrightarrow_2\longleftarrow_2$) and pCB429 (5'-aaaAATCACAATCACATGTGATTAATCACAagg-3', $\longrightarrow_2\longleftarrow\longrightarrow$)]. In the HindIII-KpnI DNA fragments the heptads with flanking three adenosines at the 5'-end and three guanosines at the 3'-end are surrounded by the multi-cloning site of the vector (pUC18) composed upstream of 20 bp (5'-AGCTTGCATGCCTGCAGGTC-3') and downstream of 19 bp (5'-GACTCTAGAGGATCCCCGG-3'). The resulting HindIII-KpnI DNA fragments are therefore 52 (one heptad), 59 (two heptads), 66 (three heptads) and 73 bp (four heptads) in length. The DNA fragments were purified and the expected sequences confirmed by sequencing.

Plasmids pCB426, pCB533, pCB427, pCB428 and pCB481 were constructed containing two directly repeated heptads separated by 1-bp (e.g., 5'-aaaAATCACA[A]A-ATCACAggg-3', \longrightarrow [A] \longrightarrow), 2-bp (\longrightarrow [AT] \longrightarrow), 3-bp (\longrightarrow [ATA] \longrightarrow), 4-bp (\longrightarrow [ATAG] \longrightarrow), 5-bp (\longrightarrow [ATAGG] \longrightarrow), 6-bp (\longrightarrow [ATAGGG] \longrightarrow) and 7-bp (\longrightarrow [ATAGGGA] \longrightarrow). The constructs are surrounded by the multi-cloning site of the vector. The lengths of the HindIII-KpnI DNA fragments with insertions between heptads used for DNase I footprinting experiments are: 60 (\longrightarrow [1] \longrightarrow), 61 (\longrightarrow [2] \longrightarrow), 62 (\longrightarrow [3] \longrightarrow), 63 (\longrightarrow [4] \longrightarrow) and 66-bp (\longrightarrow [7] \longrightarrow).

Oligonucleotides containing two directly repeated heptads (5'-aaaAATCACAAATCACAggg-3') were modified on one of the heptads by single base pair substitutions. The wild type (wt) nucleotide sequence of both strands was modified by replacing, at each position, one nucleotide by the other three nucleotides. The mutated oligonucleotides were annealed, gel purified, joined to HindII-cleaved pUC18 DNA and transformed into XL1-Blue competent cells. The DNAs of the clones were purified and the results of site-directed mutagenesis were confirmed by sequence analysis. Since nucleotides in the first and seventh position show natural A/T variance they were consequently only mutated to C and G. In the following list of constructs the mutations are given in parentheses: pCB536 (A1→C), pCB537 (A1→G); pCB438 (A2→T), pCB439 (A2→G), pCB440 (A2→C); pCB501 (T3→A), pCB515 (T3→G), pCB502 (T3→C); pC521 (C4→T), pCB518 (C4→A), pCB482 (C4→G); pCB480 (A5→T), pCB522 (A5→C), pCB479 (A5→G); pCB444 (C6→T),

pCB443 (C6→A), pCB442 (C6→G); pCB446 (A7→C), pCB445 (A7→G).

Chemicals, DNA, enzymes, proteins and reagents

All chemicals were p.a. grade and purchased from Merck, Darmstadt, Germany. DNA restriction and modification enzymes, dNTPs, and poly[d(I-C)] were from Boehringer Mannheim, Germany. Ultrapure acrylamide was from Serva, Heidelberg, Germany. The broad protein molecular weight marker was obtained from Gibco-BRL, Barcelona, Spain.

The buffers used were: buffer A, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 2 mM DTE, 0.2 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 5% glycerol; buffer B, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl.

For EMSA and footprinting experiments, the HindIII-KpnI DNA segments (59 bp, two heptads, 66 bp, three heptads and 73 bp, four heptads) or EcoRI-SphI DNA fragments (71 bp, three heptads; and 78 bp, four heptads), were end-labeled by the filling-in reaction using the Klenow enzyme at the HindIII or EcoRI sites, and gel purified.

For Biacore experiments single biotinylated (Bio) double stranded (ds) oligonucleotides containing the specified number of heptads, flanked by Bio-gtgcaat at the 5'-end and tattca at the 3'-end [one (20 bp, e.g., 5'-Bio-gtgcaatAATCACAtattca-3', (→)), two (27 bp) in (→₂) or (→ ←) orientation, three (34 bp) in the (→₃) or (→₂ ←) and four heptads 41 bp (→₄)] and their non-biotinylated complementary strands were annealed, purified and bound to the SPR chip.

Oligonucleotides for CD studies containing the specified number of heptads, flanked by gcg at the 5'-end and gg the 3'-end [one (12 bp, e.g., 5'-gcgAATCACAgg-3'), two (19 bp) (→₂), (→ ←) or (← →), three (26 bp) (→₃), and four heptads (33 bp) (→₄)] in the indicated orientation and their complementary strands were annealed and purified by ion exchange chromatography using a Mono Q column. The concentration of DNA is expressed as moles of nucleotides and was determined using a molar extinction coefficient of 6500 M⁻¹cm⁻¹ at 260 nm.

The ω₂ protein was purified as previously described (25,26). The protein concentration is expressed in moles of ω₂ dimers and was determined from the absorbance at 276 nm using an absorption coefficient of A_{1%,1cm} = 3.63 (26).

Measurement of protein-DNA interactions

For EMSA, gel purified [³²P]HindIII-KpnI DNA (2 nM) was incubated with various amounts of ω₂ and in the presence of 1 μg poly [d(I-C)] as non-specific competitor DNA in buffer B for 15 min at 37°C in 20 μl final volume as previously described (2). The mixture was then separated using an 8% non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (ndPAGE). The ndPAGE were run with 0.5× Tris-borate-EDTA (24) at 45 V at 4°C and dried prior to autoradiography.

To obtain apparent dissociation constant ($K_{d,app}$) values from EMSA and DNase I footprint experiments, concentrations of free DNA and ω₂-DNA complexes were densitometrically determined under non-saturating conditions from

differently exposed autoradiographs of EMSA and DNase I footprinting gels. ω₂ protein concentrations that transfer 50% of the ³²P-DNA into complexes or protect 50% from DNase I digestion are approximately equal to the $K_{d,app}$ under conditions where the DNA concentration is much lower than $K_{d,app}$. Since DNA concentrations used in the EMSA and DNase I protection experiments are 2 nM, reliable results are expected for $K_{d,app}$ values above 20 nM. In SPR experiments, the ω₂ protein concentrations at 50% of the maximal resonance units (RU) values were taken as equivalent to $K_{d,app}$. The reaction conditions for DNase I footprint experiments were as for EMSA. DNase I treatment was as previously described (2). The samples were resuspended in loading buffer [80% (v/v) formamide, 1 mM EDTA, 0.1 % (v/v) bromophenol blue and 0.1% (v/v) xylene cyanol], separated in 15% denaturing PAGE (dPAGE) and were autoradiographed. For size control marker, ladders obtained with the chemical sequencing reaction (G+A) on the same DNA fragments were used.

SPR was measured in real time as previously described (27) using a Biacore 2000 instrument with biotinylated synthetic DNA immobilized on a Streptavidin sensor chip. By construction, all chips contained the same molar concentration of heptads, although the number of heptads per DNA molecule was different. After the DNA segments were coupled to the streptavidin-coated surface of the flow cells, kinetics of binding were measured with ω₂ concentrations ranging from 0.8 to 100 nM. The SPR signal was measured in RU, 100 RU corresponding to 0.1 ng/mm² of ω₂ bound to the chip. The rate and equilibrium binding constants and Hill coefficients were calculated using BIAevaluation 3.0 software.

Hydroxyl radical footprinting was performed as previously described (28). [³²P]HindIII-KpnI or EcoRI-SphI DNA (2 nM) and 1 μg of poly [d(I-C)] as non-specific competitor DNA were incubated with various amounts of ω₂ protein in a total volume of 20 μl in buffer B. After 20 min incubation at 30°C, the footprint was started by addition of 3 μl of a freshly prepared solution containing 4 mM EDTA, 2 mM ammonium iron(II)-sulfate hexahydrate, 14 mM sodium ascorbate and 1.5% H₂O₂. After 4 min, the reaction was stopped by addition of 2 μl of 100 mM thiourea and 2 μl of 0.5 M EDTA. Samples were diluted 1:1 with water, and the DNA ethanol precipitated. The samples were resuspended in loading buffer separated in 15% dPAGE, and the gels were autoradiographed. For the analysis of the footprint the intensities of random bands (6 to 8), in each lane, outside the footprinting area were added and used to obtain a normalization factor. This factor served to correct any potential loading error in the different lanes. The normalized band intensities of protein-free control were then subtracted from the corresponding band intensities of the lanes of the protein-containing DNA.

CD spectra in the 320–250 nm region were measured at 20°C using a Jasco J720 spectropolarimeter. For titration of DNA with ω₂ protein, aliquots of a concentrated ω₂ solution in buffer B were added to the desired DNA solutions in a 5 mm path-length cuvette, mixed and incubated for 15 min at 20°C before measurements. For the calculation of the stoichiometries the ellipticity differences at 264 nm between ω₂:DNA complexes and free DNA was plotted versus the molar ratio ω₂:DNA.

RESULTS

ω_2 protein binds to heptad repeats with different orientation

In pSM19035, upstream of the *copS*, δ and ω genes there are 10, nine and seven copies of the 7 bp repeat 5'-^A/TATCAC^A/T-3', respectively (Fig. 1). These heptads are the suspected ω_2 binding sites (2); however, alternative ω_2 protein binding sites have not been formally ruled out (see dashed arrows in Fig. 1).

Using EMSA we studied the complex formation of ω_2 with the 59 to 73 bp long [α -³²P]HindIII–KpnI DNA fragments containing one to four unspaced heptads as a function of ω_2 protein concentration. We failed to detect binding of ω_2 (up to 500 nM) to DNA fragments containing only one heptad. The $K_{d,app}$ that were obtained from EMSA are summarized in Table 1.

The ω_2 protein concentration required to bind 50% of the DNA containing two heptads in the head-to-head $\rightarrow\leftarrow\leftarrow$ configuration is apparently lower than for binding DNA containing heptads in the \rightarrow_2 or $\leftarrow\leftarrow\rightarrow$ orientation. The $K_{d,app}$ values (equivalent to the ω_2 concentration required to protect 50% of the DNA) are 20, 90 and 120 nM, respectively (Fig. 2B, A and C, Table 1). Only one shifted band was observed with heptads in the \rightarrow_2 , $\rightarrow\leftarrow\leftarrow$ and $\leftarrow\leftarrow\rightarrow$ orientation (Fig. 2A to C denoted by arrowheads).

The affinity of ω_2 binding to DNA containing three and four heptads (Fig. 2D–H) is similar to full-length sites (4–12 nM) (2). With the exception of diheptads (Fig. 2A–C) and of DNA in the $\rightarrow_2\leftarrow\leftarrow\rightarrow$ configuration where only one shifted band was observed (Fig. 2H), the formation of higher order complexes was observed for DNA with increased number of adjacent heptads. One to three shifted bands were observed when the DNA fragment encompassed three or four heptads, respectively (denoted by brackets in Fig. 2D–G). This indicates that the 7-bp heptads are the binding site for ω_2 protein and that a minimum of two heptads is required for initial binding. This rules out the binding of ω_2 protein to alternative sites, as the palindromic sequences denoted by dashed converging arrows in Figure 1. The observed heterogeneity of formed complexes suggests a varying occupancy of the heptad binding sites by ω_2 and/or a distortion of the DNA segments.

ω_2 protein protects large DNA segments against DNase I attack

To study the effect of ω_2 on the protection of DNA fragments containing two to four heptads in different orientations, the ω_2 –DNA complexes were analyzed by DNase I footprinting. Protein ω_2 failed to protect a DNA fragment containing only one heptad from DNase I attack (data not shown) whereas discrete regions of DNA containing two to four heptads were protected. In most of the studied DNA fragments the protected region is longer than the stretch of heptad sequences, namely ~18 bp in length for \rightarrow_2 (Fig. 3A), ~22 bp for $\rightarrow\leftarrow\leftarrow$ (Fig. 3B), ~28 bp for $\rightarrow_2\leftarrow\leftarrow$ (Fig. 3D) and \rightarrow_3 (Fig. 3E) and ~36 bp for \rightarrow_4 (Fig. 3F) and $\rightarrow_2\leftarrow\leftarrow_2$ (Fig. 3G). The protection is mainly extended at the upstream ends of the dsDNA. As shown in Figure 3C and H, the protected regions from DNase I attack were shorter than the heptad stretches with ω_2 protein protecting only ~12 bp in a DNA segment

Table 1. $K_{d,app}$ in nM of ω_2 necessary to achieve half saturation of 2 nM DNA

Orientation and number of heptads	EMSA	DNase I footprinting	SPR
\rightarrow	>500	>500	>500
\rightarrow_2	~90	~25	~20
$\rightarrow\leftarrow\leftarrow$	~20	~25	~20
$\leftarrow\leftarrow\rightarrow$	~120	~140	ND
\rightarrow_3	~12	~12	~10
$\rightarrow_2\leftarrow\leftarrow$	~12	~12	~10
\rightarrow_4	~8	~7	~6
$\rightarrow_2\leftarrow\leftarrow_2$	~6	~8	ND
$\rightarrow_2\leftarrow\leftarrow\rightarrow$	~14	~14	ND
$(\rightarrow_2\leftarrow\leftarrow)_3\rightarrow$	~4	~5	~6

ND, not determined.

containing two heptads in the $\leftarrow\leftarrow\rightarrow$ orientation and ~26 bp in a DNA fragment with four heptads in $\rightarrow_2\leftarrow\leftarrow\rightarrow$ orientation. In the latter case, the upstream region and the first three heptads were protected from DNase I attack by ω_2 , but the fourth heptad (at the 3'-end) was not protected (Fig. 3H).

With the exception of heptads in the $\leftarrow\leftarrow\rightarrow$, $\rightarrow_2\leftarrow\leftarrow_2$ and $\rightarrow_2\leftarrow\leftarrow\rightarrow$ orientations (Fig. 3C, G and H) where single sensitive sites interrupted by protected regions were observed, continuous protection from DNase I attack by ω_2 were found with DNA containing two ($\rightarrow\leftarrow\leftarrow$ and \rightarrow_2), three ($\rightarrow_2\leftarrow\leftarrow$ and \rightarrow_3) and four (\rightarrow_4) heptads (Fig. 3A, B, D, E and F). Protection from DNase I attack was also observed in the upstream region, where heptads were not present, with DNA containing two ($\rightarrow\leftarrow\leftarrow$ and \rightarrow_2), three ($\rightarrow_2\leftarrow\leftarrow$ and \rightarrow_3) and four (\rightarrow_4) heptads (Fig. 3A, B, D–F). As previously postulated (2), this is most likely caused by formation of a large nucleoprotein complex in which non-specific binding of ω_2 to the flanking DNA regions is nucleated from the *PcopS*, *P ω* and *P δ* or *parS* region (see Fig. 1).

The protection effect of ω_2 was quantified by densitometric scanning of the autoradiographs (see Fig. 3). Protein ω_2 binds with similar affinity to two heptads with the $\rightarrow\leftarrow\leftarrow$ or \rightarrow_2 orientation ($K_{d,app}$ ~25 nM) and three and four heptads ($K_{d,app}$ 5–12 nM) (Table 1).

There is a difference in the $K_{d,app}$ as determined by EMSA and DNase I for ω_2 –DNA complexes with the heptads in the \rightarrow_2 orientation ($K_{d,app}$ 90 and 25 nM, respectively) when compared to the $\rightarrow\leftarrow\leftarrow$ orientation ($K_{d,app}$ ~25 nM in both cases), which might suggest a faster off rate of ω_2 for \rightarrow_2 DNA under the conditions of EMSA. The ω_2 concentrations required to protect 50% of the tail-to-tail ($\leftarrow\leftarrow\rightarrow$) DNA segments are similar when determined with both EMSA and DNase I footprinting ($K_{d,app}$ ~130 nM) (Table 1).

Kinetics of ω_2 protein binding to DNA

SPR experiments provided $K_{d,app}$ values similar to those determined by DNase I footprinting assays for ω_2 –DNA complexes containing different numbers and orientations of heptads (Table 1). The affinity of ω_2 to DNA containing a single heptad is low with $K_{d,app}$ > 1 μ M (Fig. 4A, Table 1). Protein ω_2 binds to DNA containing two 7-bp repeats in the \rightarrow_2 or $\rightarrow\leftarrow\leftarrow$ orientation with similar affinity ($K_{d,app}$ ~20 nM), hence only the former was shown (Fig. 4B).

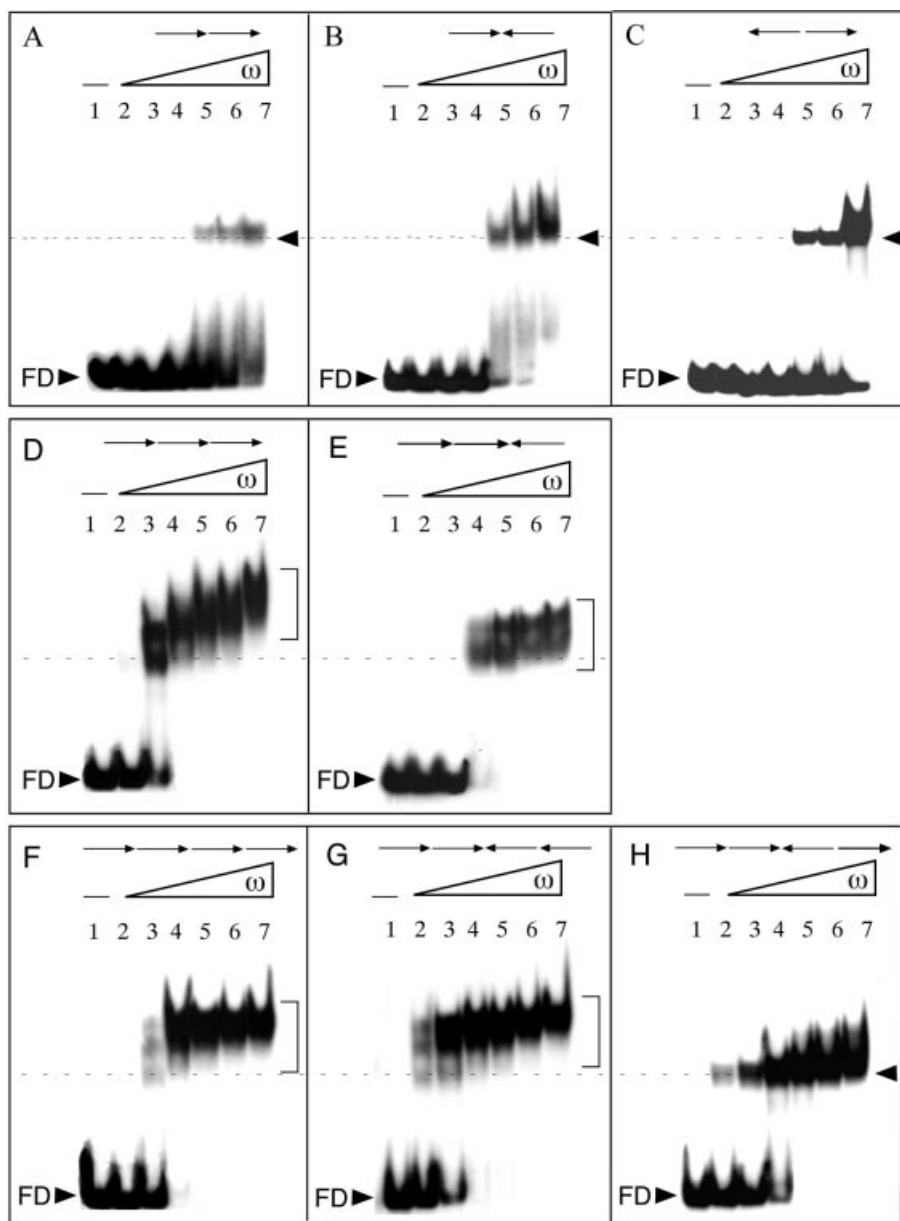


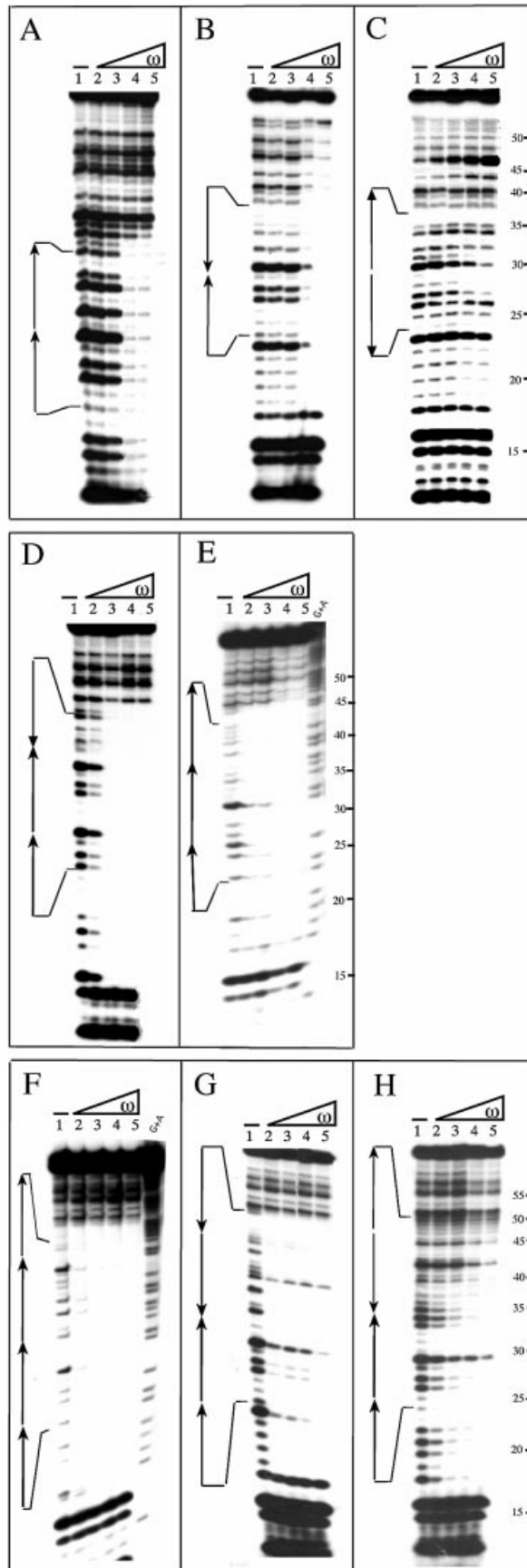
Figure 2. Interaction of ω_2 protein with DNA containing two to four heptads in different orientations. The 59 [(A–C) two heptads], 66 [(D and E) three heptads] and 73 bp [(F–H) four heptads] [α - 32 P]HindIII–KpnI DNA (2 nM) and 1 μ g of poly[d(I–C)], as non-specific competitor DNA, were incubated with increasing concentrations of ω_2 in buffer B for 15 min at 37°C. The formed ω_2 –DNA complexes were analyzed by EMSA. The arrows at the top of the gels indicate number and orientation of the 7 bp repeats. An arrowhead or a bracket to the right of the bands indicates the type(s) of ω_2 –DNA complexes. A broken line indicates the position of the fastest moving complexes, detected at low protein concentration. Except in (C), the ω_2 protein concentrations were 4, 8, 16, 32, 64 and 128 nM (lanes 2–7, respectively). In (C) the ω_2 concentrations were 8, 16, 32, 64, 128 and 256 nM. The symbol – in lane 1 indicates the absence of protein, FD labels the band due to free DNA.

The association ($k_a \sim 1 \times 10^7 \text{ ms}^{-1}$) and dissociation ($k_d \sim 0.1 \text{ s}^{-1}$) rate constants are similar for ω_2 binding to DNA containing three heptads in $\rightarrow_2 \leftarrow$ (Fig. 4C) and \rightarrow_3 orientation and to DNA containing four heptads in the \rightarrow_4 orientation (Fig. 4D). Although the different chips are coated with the same number of binding sites, the moles of bound DNA differ according to the different number of heptads per DNA molecule. We assume that differences in conformation of the DNA targets account for the small differences in $K_{d,\text{app}}$ between targets with two (20 nM) and three or four repeats

($K_{d,\text{app}}$ 6–10 nM) and not the statistical degeneracy of the macroscopic binding constant (29). A similar binding affinity was observed when the full-length site (Fig. 1) containing seven to 10 repeats ($K_{d,\text{app}}$ 4–10 nM) was studied (2).

Binding of ω_2 protein induces conformational changes in DNA

Titration of DNA containing two \rightarrow_2 , three \rightarrow_3 and four \rightarrow_4 direct heptads (Fig. 5A–C) with ω_2 was accompanied by spectral changes in the DNA region between 250 and 320 nm.



Isosbestic points were found at 283 nm for DNA with two heptads, \rightarrow_2 , and at 282 nm for DNA with three \rightarrow_3 and at 281 nm for DNA with four heptads, \rightarrow_4 . The positions of the isosbestic points indicate that the CD spectra are mainly determined by two components, namely free DNA and complexes with ω_2 . The CD spectra do not discriminate between complexes differing in the number of ω_2 and position of ω_2 occupying the two, three and four binding sites per DNA. At substoichiometric amounts of ω_2 the CD spectra do not allow to deduce the possible formation of complexes with varying stoichiometry as suggested by the EMSA experiments shown in Figure 2.

Plots of $\Delta[\Theta]_{264\text{nm}}$, the difference in the ellipticity at 264 nm between ω_2 -DNA and free DNA, versus molar ratio of ω_2 to DNA containing two \rightarrow_2 (Fig. 5D), three \rightarrow_3 (Fig. 5E) or four \rightarrow_4 heptads (Fig. 5F) showed stoichiometries of binding of 2.2, 3.1 and 4.5 ω_2 per DNA with two, three and four heptads, respectively. These results, which are close to the binding of one ω_2 to one DNA heptad, indicate that each dimer binds to each half of the minimal binding site and interacts with the neighboring dimer.

Sequence selective recognition by ω_2 protein

To learn about the relevant nucleotides involved in ω_2 binding, we have substituted every base pair of the upstream heptad (5'-A/TATCAC^A/T-3', positions 1 to 7) of the \rightarrow_2 binding site, whereas the downstream heptad (positions 1' to 7') was not modified (Table 2). The protein concentration required to protect 50% of the 59-bp HindIII-KpnI target DNA from DNase I attack was determined. The replacement of A at position 1 or 7 by T (A \rightarrow T, a natural one), A \rightarrow C or A \rightarrow G does not affect the ω_2 footprinting ($K_{d,\text{app}} \sim 20$ nM), and the presence of a C at positions 1 or 7 slightly increases (2-fold) ω_2 protection to DNase I attack (see above). The A \rightarrow T or A \rightarrow G replacements at position 2 do not seem to affect the ω_2 binding, but A \rightarrow C reduced by 8-fold ω_2 protection from DNase I attack (Table 2). The T \rightarrow G replacement at position 3, C \rightarrow A or C \rightarrow G at position 4 and A \rightarrow G or A \rightarrow T replacements at position 5 or replacement of C at position 6 for any other base pair reduced ω_2 protection from DNase I attack by >7-fold (Table 2). The other replacements revealed an intermediate affinity for ω_2 (Table 2).

The base specific effects of changes in positions 2 and 3 and more general effects of base pair exchanges in positions 4 to 6, which drastically affect the binding of ω_2 to a diheptad DNA, suggest that: (i) the ω_2 operator site consists of two highly similar heptads, (ii) each heptad defines an *operator half site*

Figure 3. DNase I footprinting experiments of ω_2 -DNA complexes. The [α - ^{32}P]HindIII-KpnI DNA fragments (bottom strand) described in Figure 2 (containing two to four heptads) were used. The number, location and orientation of the 7 bp repeats are indicated by arrows. [α - ^{32}P]DNA (2 nM) and 1 μg of poly [d(I-C)], as non-specific competitor DNA, were incubated with increasing concentrations of ω_2 in buffer B for 15 min at 37°C, followed by limited digestion with DNase I. Except in (C), the ω_2 concentrations were 8, 16, 32 and 64 nM (lanes 2–5, respectively). In (C) the ω_2 concentrations were 32, 64, 128 and 256 nM. The symbol – in lane 1 indicates the absence of ω_2 . The G+A lanes at the right of (E) and (F) were obtained by chemical sequencing reaction (Maxam-Gilbert) and used as size standard. The numbers to the right of (C), (E) and (H) refer to nucleotide positions in the sequence of the studied DNA.

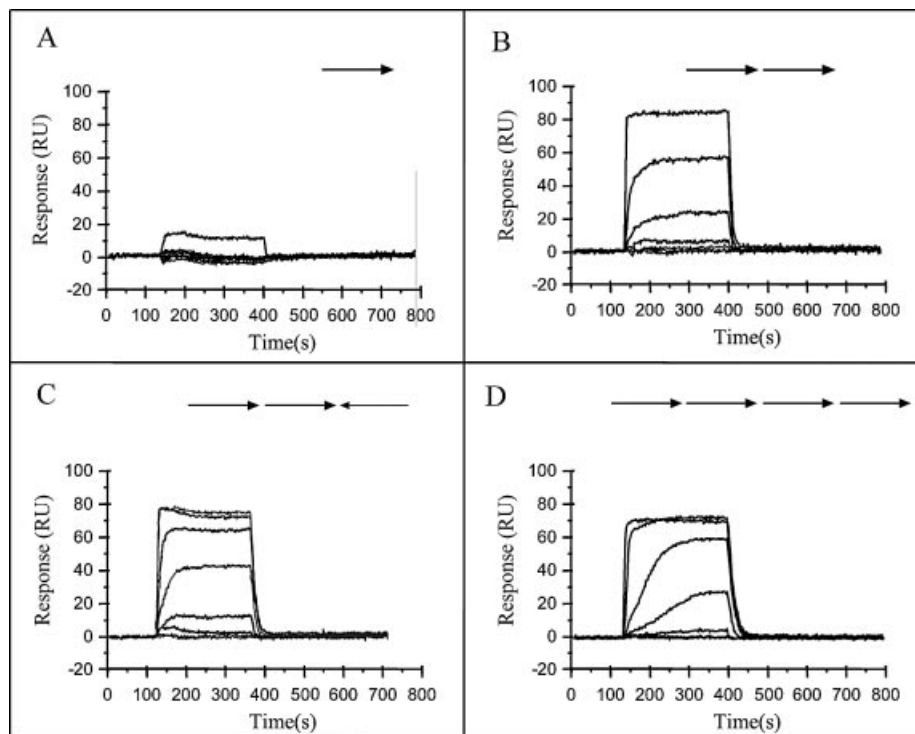


Figure 4. SPR studies of the interaction of ω_2 protein with its target sites. DNA segments containing one (A), two (B), three (C) and four (D) heptads with total lengths of 20, 27, 34 and 41 bp, respectively, have been used. The nucleotide sequences are presented in Materials and Methods and number and orientation of the heptads are indicated by arrows. The sensograms were obtained at different ω_2 concentrations (1.6, 3.2, 6.4, 12.5, 25, 50, 100 and 200 nM). Several curves overlap at low ω_2 concentrations [three and two curves in (C) and (D), four curves in (B), and seven curves in (A)].

and (iii) the pentameric central 5'-ATCAC-3' or its complementary sequence is relevant for ω_2 binding. Identical results were obtained when the mutations were introduced in one of the repeats of two inversely oriented heptads (data not shown).

ω_2 protein interacts with the 5'-ATCAC-3' central core

Hydroxyl radical footprinting of ω_2 -DNA complexes with DNA containing two (\rightarrow_2) and four (\rightarrow_4) heptads showed a different protection pattern at both DNA strands. The distribution of protected positions at the 'top' strand was different to that observed at the 'bottom' strand, suggesting that ω_2 interacts differently with each strand. As revealed in Figure 6A and B, the bases at the 'top' strand that were protected by ω_2 protein on a \rightarrow_4 DNA segment from the attack of hydroxyl radicals cluster in the 5'-AT-3' or 5'-ATC-3' sequence (positions 2 and 3 or 2 to 4). The protected bases of the first heptad cannot be quantified due poor resolution of the gel. The protected regions on the other three heptads are separated by four or five non-protected nucleotides (Fig. 6B). On the 'bottom' strand the bases protected by ω_2 protein cluster in the 5'-GTG-3' sequence (positions 4 to 6). Here the protected bases of the fourth heptad cannot be quantified due poor resolution of the gel. The protected regions on the three heptads are separated by four non-protected nucleotides (Fig. 6C).

Hydroxyl radical footprinting of a ω_2 -DNA complex with DNA containing three heptads in the $\rightarrow_2\leftarrow_2$ orientation was also assayed (Fig. 7A-C). On the 'top' strand the bases protected on the two directly repeated heptads cluster in the 5'-

AT-3' or 5'-ATC-3' sequence and in the inversely repeated heptad they cluster in the 5'-GTG-3' sequence (Fig. 7C). On the 'bottom' strand the protected bases cluster in the 5'-GTG-3' sequence of the directly repeated heptads and in the 5'-AT-3' or 5'-ATC-3' sequence of the inversely repeated heptad (Fig. 7A and B).

ω_2 protein binds poorly to a spaced core binding motif

The ω_2 protein probably binds to the DNA major groove with two anti-parallel β -strands, featuring two arginines (Arg31, Arg31') that point to the base pairs and possibly recognize both guanines (10). In a previous section it is shown that: (i) a mutation at the central core of the upstream heptad in \rightarrow_2 configuration for any other nucleotide reduces ω_2 binding >8-fold compared to the cognate site (Table 2), and (ii) ω_2 protein specifically protects the 5'-ATCAC-3' segment of the heptads.

To address whether the protein binds to a spaced target site, the spacing of two direct ω_2 core motifs was varied by 1 ($\rightarrow_2[1]\rightarrow_2$) to 7 bp ($\rightarrow_2[7]\rightarrow_2$), and the protection of DNA by bound ω_2 protein was determined by DNase I footprinting. All these separated heptads failed to form measurable ω_2 -DNA complexes in the presence of up to 40 nM ω_2 . Half maximal saturation was observed in the presence of 100–120 nM ω_2 to diheptads separated either by 1 ($\rightarrow_2[1]\rightarrow_2$) to 7 bp ($\rightarrow_2[7]\rightarrow_2$) indicating a 5- to 6-fold reduced binding affinity when compared with the unspaced cognate \rightarrow_2 site ($K_{d,app} \sim 20$ nM). Identical results were obtained when the spacing of two inversely oriented heptads

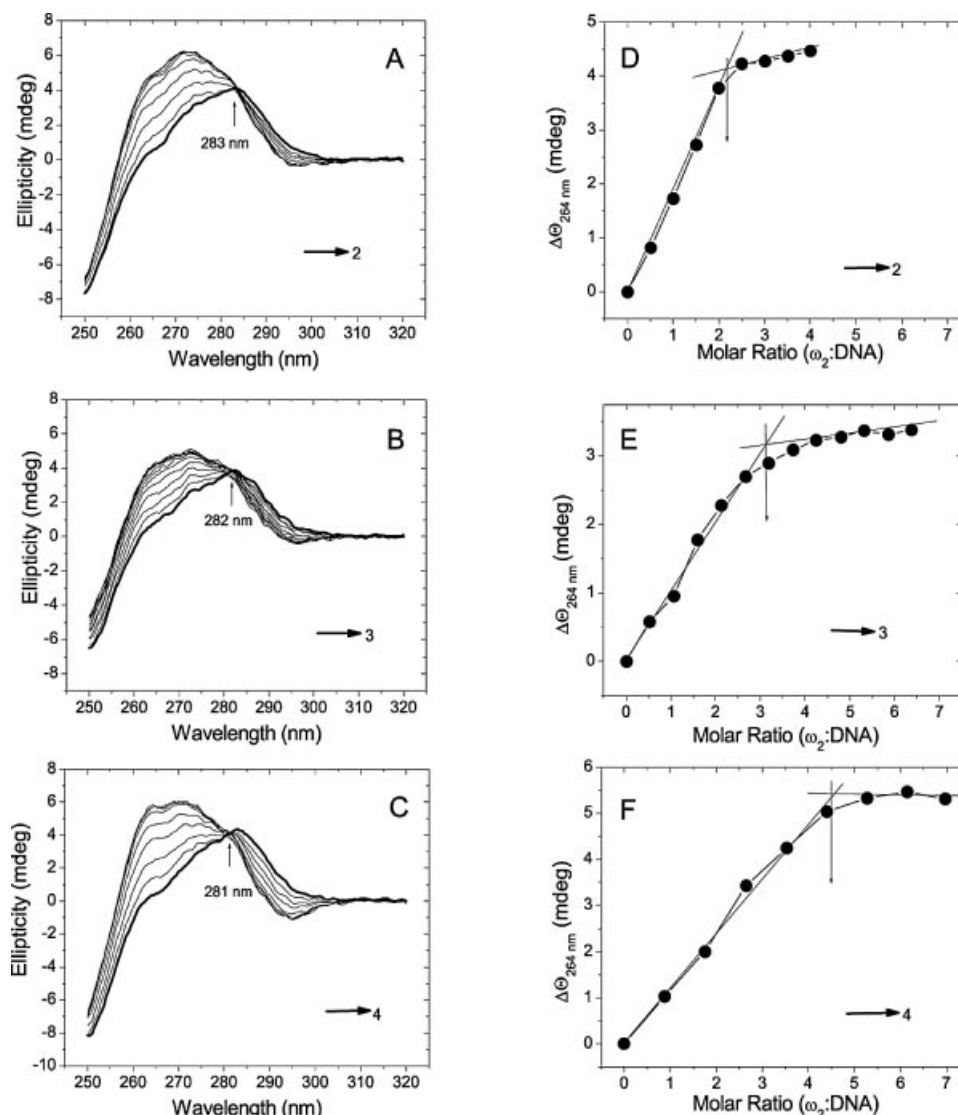


Figure 5. Titration of DNA with ω_2 protein. CD spectra of DNA with two heptads in the \rightarrow_2 orientation (A), three heptads in the \rightarrow_3 orientation (B) and four heptads in the \rightarrow_4 orientation (C) are shown. Free DNA is indicated by thick lines, the DNA start concentrations are 3.2 (A), 2.09 (B) and 2.09 μM (C); ω_2 concentrations increase from 1.6 to 10.1 μM (A), 1.8 to 12.7 μM (B) and 1.8 to 12.8 μM (C). In (D), (E) and (F) is plotted the ellipticity increase at 264 nm induced in solutions of DNA [data from (A), (B) and (C), respectively] versus the ω_2 :DNA molar ratio. Saturation is achieved at molar ratios of $\sim 2.2:1$, $\sim 3.1:1$ and $\sim 4.5:1$ with DNA containing two, three and four heptads, respectively. The samples were in buffer B at 20°C.

($\rightarrow[1] \leftarrow$ to $\rightarrow[7] \leftarrow$) were used (data not shown). Similarly the Arc repressor binds poorly to spaced half sites (30).

DISCUSSION

The DNA binding site of ω_2 at the *PcopS*, *P δ* and *P ω* promoter regions is composed of an array of adjacent unspaced heptads (see Fig. 1). Unlike the Arc dimers, which bind to each subsite with nanomolar affinities (31), the ω_2 protein binds with low affinity ($K_{d,\text{app}} > 1 \mu\text{M}$) to a subsite or single heptad. The ω_2 protein binds with high specificity and affinity to two ($K_{d,\text{app}} \sim 20 \text{ nM}$) or more unspaced heptads ($K_{d,\text{app}} 4\text{--}12 \text{ nM}$). The characterization of several heptads in different orientation has led to the identification of a consensus ω_2 operator site

composed of two conserved and unspaced heptads (5'- A /TATCAC A /T-3') to which two ω_2 bind with high affinity. This is consistent with stoichiometry experiments that show that 2.2, 3.1 and 4.5 ω_2 molecules bind DNA segments containing two, three and four heptads, respectively. It is likely, therefore, that each heptad defines an operator half-site.

A reduced (3- to 6-fold) ω_2 binding affinity to two heptads spaced by 1 to 7 bp was observed. Similar results have been reported for other members of the RHH protein family when the binding site was artificially spaced (30,32). Each ω_2 protein contacts a 3 to 5 bp sequence in each DNA half site (heptad) (33; this work). Heptads in inverted $\rightarrow\leftarrow$ and divergent $\leftarrow\rightarrow$ orientations have palindromic symmetry, which allows the symmetry-related binding of two ω_2 proteins to each of the two heptads, whereas ω_2 -DNA complexes with

Table 2. Binding of ω_2 protein to DNA studied by DNase I protection experiments

Modified position	Nucleotide position ^a	[ω_2] required to reach $K_{d,app}$ (in nM)
	1 2 3 4 5 6 7 1' 2' 3' 4' 5' 6' 7'	
–	5'–...a A T C A C a a A T C A C a ...-3'	~20
1	5'–...C → → → → → ...-3'	~10
1	5'–...G → → → → → ...-3'	~20
2	5'–...–T → → → → → ...-3'	~20
2	5'–...–C → → → → → ...-3'	>160
2	5'–...–G → → → → → ...-3'	~20
3	5'–...–A → → → → → ...-3'	~80
3	5'–...–C → → → → → ...-3'	~80
3	5'–...–G → → → → → ...-3'	~160
4	5'–...–T → → → → → ...-3'	~80
4	5'–...–A → → → → → ...-3'	~160
4	5'–...–G → → → → → ...-3'	>160
5	5'–...–T → → → → → ...-3'	>160
5	5'–...–C → → → → → ...-3'	~160
5	5'–...–G → → → → → ...-3'	~160
6	5'–...–T → → → → → ...-3'	>160
6	5'–...–A → → → → → ...-3'	>160
6	5'–...–G → → → → → ...-3'	>160
7	5'–...–C → → → → → ...-3'	~10
7	5'–...–G → → → → → ...-3'	~20

The DNA contained two directly repeated heptads of which the upstream one was mutated by one base in consecutive positions as shown on each line.

^aThe heptad sequences are flanked by three adenines at the 5'-ends and three cytosines at the 3'-ends and surrounded by the multi-cloning site of the vector. The base pair difference with wt is highlighted.

adjacent heptads in tandem orientation \rightarrow_2 are not symmetry-related. The interfaces between ω_2 in complexes with symmetry-related and non-symmetry-related heptads \rightarrow_2 might be different. Except EMSA, DNase I and chemical footprinting and SPR techniques showed that ω_2 protein binds with comparable high affinity to diheptads in \rightarrow_2 or $\rightarrow\leftarrow$ orientation, $K_{d,app}$ ~20 nM, but binds to a diheptad in the $\leftarrow\rightarrow$ orientation with ~6-fold lower affinity, $K_{d,app}$ ~130 nM.

Three heptads in \rightarrow_3 or $\rightarrow_2\leftarrow$ orientation or four heptads in the \rightarrow_4 , $\rightarrow_2\leftarrow\rightarrow$ or $\rightarrow_2\leftarrow_2$ orientations form high affinity binding sites for ω_2 protein, as judged by EMSA, DNase I footprinting or SPR. The affinity of these heptads is comparable to that observed with the full-length binding site (2). All these data are consistent with the observation that the affinity of ω_2 for a specific promoter does not increase by increasing the number of heptads in the respective operator, provided that there are at least three or four heptad repeats (2; this work). Upon binding to its cognate site, ω_2 protein at high concentration has the tendency to polymerize on the 5' region of the 'top' strand (2), an effect that has yet to be understood.

Genetic and biochemical experiments show that the bases of the 5'-ATCAC-3' core or the complementary 5'-GTGAT-3' sequence are essential for the interaction of ω_2 . Hydroxyl radical footprints show that ω_2 mainly interacts with the central 5'-TCA-3' sequence. This has been confirmed by Raman spectroscopy, showing that the central 5'-TCA-3' motif of the heptads might be the main target site for ω_2 binding to operator DNA (34).

The N-terminal regions (1–23 and 1–22 in subunits I and II, respectively) of ω_2 are not defined in the electron density due to proteolysis during crystallization and partial disorder (10). *In vivo* experiments demonstrated that plasmid-based ω_2 variants lacking the first 20 residues specifically repress utilization of a chromosomal-based *P δ* promoter (F. Pratto,

unpublished results). It is likely therefore that the flexible N-terminus is not involved in binding of ω_2 protein to operator sequences. According to a preliminary model ω_2 protein binds to the DNA major groove with the two anti-parallel β -strands (formed by residues Lys28 to Val32 and Lys28' to Val32') (10).

The operator sites of other RHH proteins (namely the MetJ, Arc and CopG proteins) show an overall bend of ~50–60° in the protein–DNA complexes (7,9,33). This agrees with CD titration experiments that show conformational changes in DNA upon ω_2 binding, and Raman spectra indicate an induced fit of both, ω_2 and DNA, as shown by changes in vibrational modes of deoxyribose moieties and protein-induced DNA bending (34). By contrast, DNase I footprint experiments did not indicate the presence of hypersensitive sites upon ω_2 binding to its cognate site (see Fig. 3).

Crystal structures of repressor–DNA complexes of MetJ (6), Arc (7,8) and CopG (9) have shown that these repressors bind as two dimers to palindromic operator sites. MetJ binds symmetrically to tandem binding sites (6), whereas the interaction of Arc and CopG with their palindromic cognate sites is asymmetric (7,9). The distances between the binding centers of the two dimers on the DNA are different: MetJ 8 bp apart, Arc 11 bp apart, Mnt and CopG each 9 bp apart. The β -ribbon of each of the repressors comprises seven to nine amino acid residues per monomer in MetJ, Arc, Mnt and CopG. By contrast, only five amino acid residues form the β -ribbon in ω_2 protein (10) and the centers of the half-sites are only 7 bp apart in agreement with the heptad repeat structure of operator DNA. For any heptad orientation ($\rightarrow\leftarrow$, \rightarrow_2 or $\leftarrow\rightarrow$) the 5'-TCA-3' motifs are separated by a center-to-center spacing of 7 bp and rotated relative to each other by $7 \times 34^\circ = 238^\circ$. Therefore, like MetJ (32), ω_2 bound to seven to 10 heptads should wrap around the DNA helix.

Figure 8 shows a model of the ω_2 –DNA complex that is based on the MetJ–DNA complex as the RHH motifs are

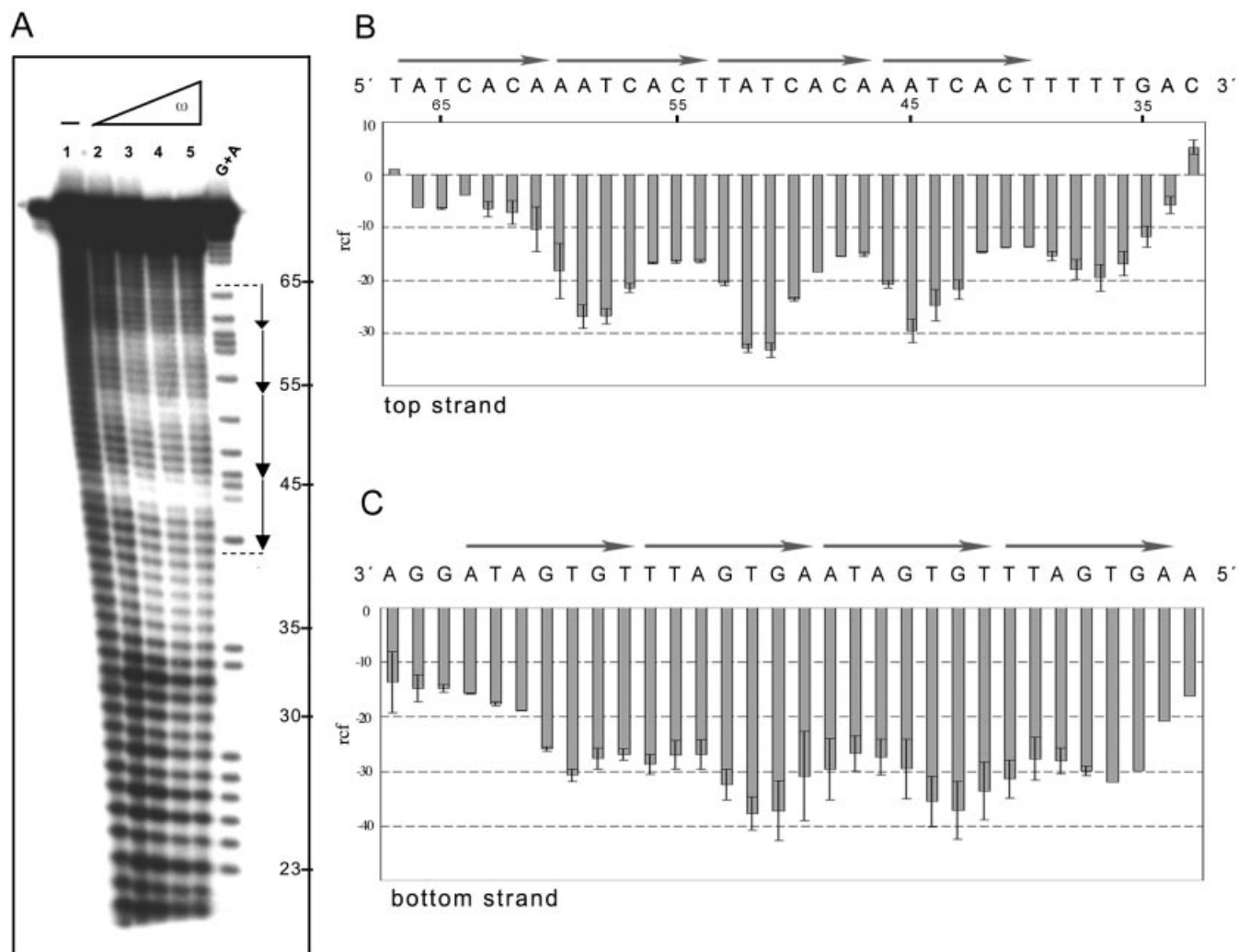


Figure 6. Hydroxyl radical footprinting of ω_2 protein bound to DNA with four heptads. The 78 bp [α - 32 P]EcoRI–SphI [top strand (A and B)] or the 73 bp [α - 32 P]HindIII–KpnI [bottom strand (C)] (2 nM) with four DNA heptads in \rightarrow_4 orientation, in the presence of 1 μ g of poly[d(I-C)] as non-specific competitor DNA, was incubated with increasing concentrations of ω_2 for 15 min at 37°C in buffer B, followed by hydroxyl radical footprinting. The ω_2 concentrations were 8, 16, 32 and 64 nM (lanes 2–5). The symbol – in lane 1 indicates the absence of protein. The G+A bands were used as size standards. The nucleotide sequence of the \rightarrow_4 DNA and the histogram of the hydroxyl radical footprinting of the top (B) and bottom (C) strands, are shown. The relative cleavage frequency (arbitrary units) of the bound DNA compared to the unbound control is shown. Error bars show standard deviations and represent average values from three independent experiments.

comparable (6,10,32). It illustrates the gross arrangement of three ω_2 bound to a straight B-DNA segment composed of three heptads (\rightarrow_3), each ω_2 inserting its antiparallel β -ribbon into the major groove of the DNA. The β -ribbon of ω_2 contains residues R31 on one β -strand and R31' on the other strand that are related by a 2-fold rotation axis relating the two monomers in the dimer (10). The side-chains of R31 and R31' are candidates for asymmetric contacts with guanines on the same DNA strand (motif 5'-CAC-3) in the \rightarrow_2 diheptad or for symmetric contacts with guanines on the opposite strand in the $\rightarrow\leftarrow$ diheptad (10). Since protein ω_2 binds to seven to 10 heptads: ω_2 possibly decorates the DNA helix, adjacent ω_2 being rotated relative to each other by 252° around the DNA helix axis. The distance between ω_2 α -helices A can easily be reduced to become comparable to the distance in MetJ–DNA if DNA is bent (see above) or ω_2 slightly rotated on the heptad binding site. Figure 8 also shows that due to the 2-fold

symmetry in the ω_2 dimer, two ω_2 bound to two heptads in head-to-tail orientation, \rightarrow_2 is comparable to two ω_2 bound to $\rightarrow\leftarrow$ DNA. However, depending on the heptad orientation, different helices would interact. In the \rightarrow_2 situation α -helices A' and A were located in close neighborhood at the surfaces of the two dimers, whereas in the $\rightarrow\leftarrow$ case α -helices A' of both ω_2 should be involved in interdimer interaction. In any case possible interactions between neighboring ω_2 bound to multiple heptads should sensitively depend on the spacing between the heptads, as actually observed (see above).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mrs B. Kannen for technical assistance during the spectroscopic measurements. This work was partially supported by grants BMC2003-00150 from MCT-DGI to J.C.A.,

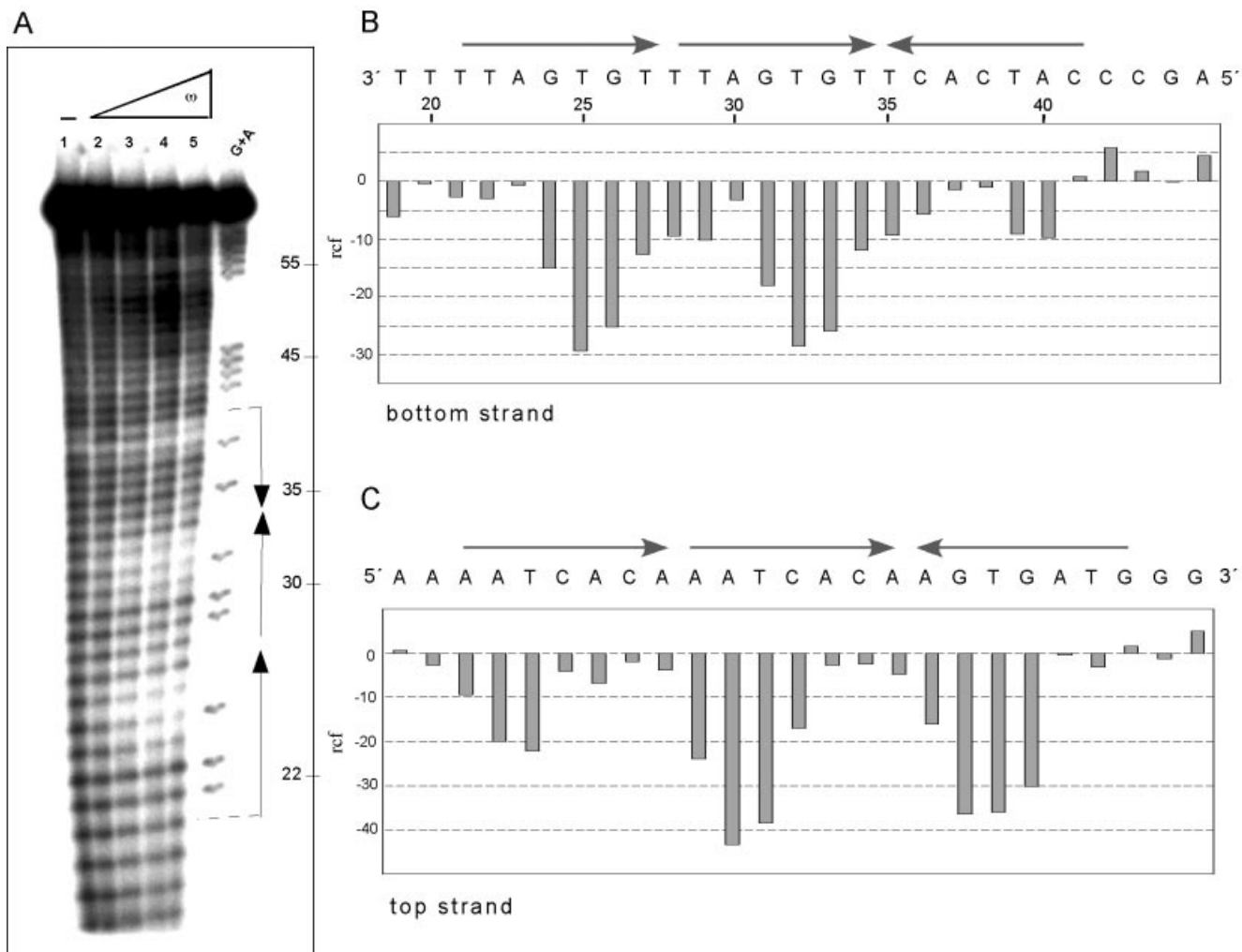


Figure 7. Hydroxyl radical footprinting of ω_2 protein bound to DNA with three heptads. The 66 bp [α - 32 P]HindIII–KpnI [bottom strand (A and B)] or the 71 bp [α - 32 P]EcoRI–SphI [top strand (C)] (2 nM) with three DNA heptads in $\rightarrow_2\leftarrow$ orientation, in the presence of 1 μ g of poly[d(I-C)] as non-specific competitor DNA, was incubated and hydroxyl radical footprinted at ω_2 concentrations as described in Figure 6. The nucleotide sequence of $\rightarrow_2\leftarrow$ DNA and histograms of hydroxyl radical footprinting of bottom (B) and top (C) strands are shown. The relative cleavage frequency is shown as described in Figure 6.

Hel318/17-1 and Wel745/5-1 to H.W. and Sa196/38-1 to W.S. from the Deutsche Forschungsgemeinschaft and Fonds der Chemischen Industrie, and EU grant QLK3-CT-2001-00277 to J.C.A., H.W. and W.S. A.B. de la H. was recipient of a Fellowship of the Gobierno Vasco and F.P. was recipient of a Fellowship of the EU grant QLK3-CT-2001-00277.

REFERENCES

- Ptashne, M. (1986) *A Genetic Switch. Gene Control and Phage Lambda*. Cell Press and Blackwell Scientific Publications, Cambridge, UK.
- de la Hoz, A.B., Ayora, S., Sitkiewicz, I., Fernandez, S., Pankiewicz, R., Alonso, J.C. and Ceglowski, P. (2000) Plasmid copy-number control and better-than-random segregation genes of pSM19035 share a common regulator. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 728–733.
- Blanco, A.G., Sola, M., Gomis-Ruth, F.X. and Coll, M. (2002) Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure (Camb)*, **10**, 701–713.
- Kalivoda, K.A., Steenbergen, S.M., Vimr, E.R. and Plumbridge, J. (2003) Regulation of sialic acid catabolism by the DNA binding protein NanR in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **185**, 4806–4815.
- Moller-Jensen, J., Borch, J., Dam, M., Jensen, R.B., Roepstorff, P. and Gerdes, K. (2003) Bacterial mitosis: ParM of plasmid R1 moves plasmid DNA by an actin-like insertional polymerization mechanism. *Mol. Cell*, **12**, 1477–1487.
- Somers, W.S. and Phillips, S.E. (1992) Crystal structure of the met repressor-operator complex at 2.8 Å resolution reveals DNA recognition by β -strands. *Nature*, **359**, 387–393.
- Raumann, B.E., Rould, M.A., Pabo, C.O. and Sauer, R.T. (1994) DNA recognition by β -sheets in the Arc repressor-operator crystal structure. *Nature*, **367**, 754–757.
- Schildbach, J.F., Karzai, A.W., Raumann, B.E. and Sauer, R.T. (1999) Origins of DNA-binding specificity: role of protein contacts with the DNA backbone. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 811–817.
- Gomis-Ruth, F.X., Sola, M., Acebo, P., Parraga, A., Guasch, A., Eritja, R., Gonzalez, A., Espinosa, M., del Solar, G. and Coll, M. (1998) The structure of plasmid-encoded transcriptional repressor CopG unliganded and bound to its operator. *EMBO J.*, **17**, 7404–7415.
- Murayama, K., Orth, P., de la Hoz, A.B., Alonso, J.C. and Saenger, W. (2001) Crystal structure of omega transcriptional repressor encoded by *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035 at 1.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **314**, 789–796.
- Golovanov, A.P., Barilla, D., Golovanova, M., Hayes, F. and Lian, L.Y. (2003) ParG, a protein required for active partition of bacterial plasmids,

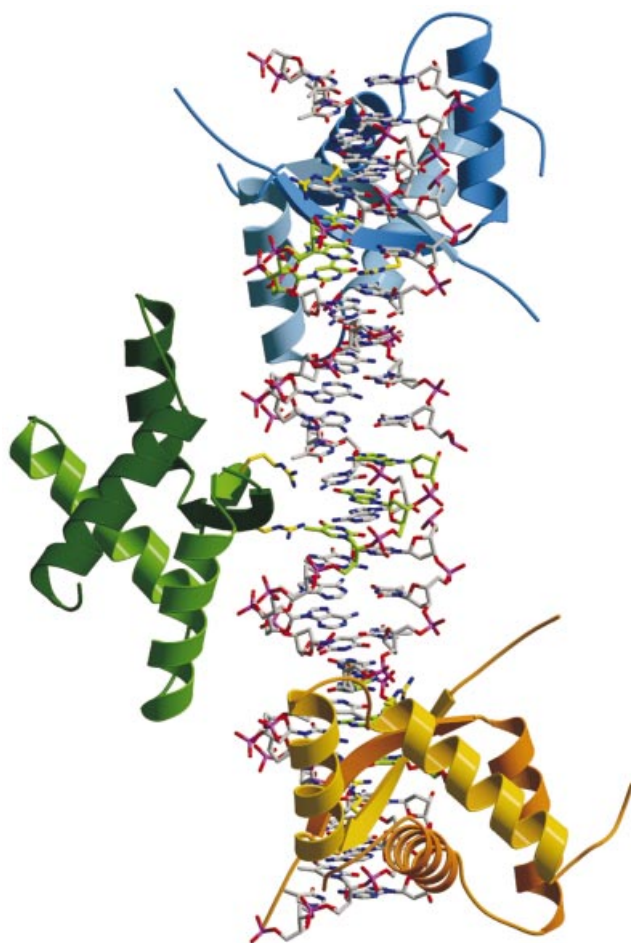


Figure 8. ω_2 -DNA complex modeled on the basis of the MetJ-DNA complex. In the latter, two MetJ dimers bind to DNA tandem repeats and the entire lengths of α -helices A of adjacent MetJ are involved in cooperative MetJ-MetJ interactions (32). Ribbon representation of three ω_2 proteins [with secondary structure ($\beta\alpha\alpha\beta$)₂] bound to a 25 bp straight B-DNA containing three heptads in direct orientation, \rightarrow_3 with center-to-center distance 7 bp shown in stick form (5'-A₁TATCAC^A₁-3', the complementary 3'-AGT-5' of the central 5'-TCA-3' were denoted in green). The antiparallel N-terminal β -structure of ω_2 binds to the DNA operator half-site and is inserted in the major groove, with R31 and R31' (their conformation in the complex is not known, indicated by yellow sticks) probably hydrogen bonding to guanine. The $\beta\alpha\alpha\beta$ subunits of each ω_2 are colored differently. The α -helices A of adjacent ω_2 are so close together that they could interact if the ω_2 -bound heptads are bent or if ω_2 is slightly rotated on the DNA binding site. The ω_2 protein bound from seven ($P\omega$) to 10 heptads ($P\omega S$, see Fig. 1) should wrap around the DNA helix.

has a dimeric ribbon-helix-helix structure. *Mol. Microbiol.*, **50**, 1141–1153.

12. Schreiter, E.R., Sintchak, M.D., Guo, Y., Chivers, P.T., Sauer, R.T. and Drennan, C.L. (2003) Crystal structure of the nickel-responsive transcription factor NikR. *Nature Struct. Biol.*, **10**, 794–799.
13. Camacho, A.G., Misselwitz, R., Behlke, J., Ayora, S., Welfle, K., Meinhardt, A., Lara, B., Saenger, W., Welfle, H. and Alonso, J.C. (2002) *In vitro* and *in vivo* stability of the $\epsilon_2\zeta_2$ protein complex of the broad host-range *Streptococcus pyogenes* pSM19035 addiction system. *Biol. Chem.*, **383**, 1701–1713.
14. Meinhardt, A., Alonso, J.C., Strater, N. and Saenger, W. (2003) Crystal structure of the plasmid maintenance system ϵ/ζ : functional mechanism of toxin zeta and inactivation by $\epsilon_2\zeta_2$ complex formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 1661–1666.
15. Rhodes, D. and Klug, A. (1986) An underlying repeat in some transcriptional control sequences corresponding to half a double helical turn of DNA. *Cell*, **46**, 123–132.
16. Xu, X., Sun, Y.L. and Hoey, T. (1996) Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science*, **273**, 794–797.
17. Xiao, H., Perisic, O. and Lis, J.T. (1991) Cooperative binding of Drosophila heat shock factor to arrays of a conserved 5 bp unit. *Cell*, **64**, 585–593.
18. Uegaki, K., Shirakawa, M., Fujita, T., Taniguchi, T. and Kyogoku, Y. (1993) Characterization of the DNA binding domain of the mouse IRF-2 protein. *Protein Eng.*, **6**, 195–200.
19. Ou, X.M., Storrer, J.M., Kushwaha, N. and Albert, P.R. (2001) Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT1A receptor gene. *J. Biol. Chem.*, **276**, 14299–14307.
20. Umesono, K., Murakami, K.K., Thompson, C.C. and Evans, R.M. (1991) Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid and vitamin D3 receptors. *Cell*, **65**, 1255–1266.
21. Naar, A.M., Boutin, J.M., Lipkin, S.M., Yu, V.C., Holloway, J.M., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1991) The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell*, **65**, 1267–1279.
22. Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R.M. and Sigler, P.B. (1995) Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature*, **375**, 203–211.
23. Studier, F.W. (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.*, **219**, 37–44.
24. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
25. Murayama, K., de la Hoz, A.B., Alings, C., Lopez, G., Orth, P., Alonso, J.C. and Saenger, W. (1999) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035-encoded omega transcriptional repressor. *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **55**, 2041–2042.
26. Misselwitz, R., de la Hoz, A.B., Ayora, S., Welfle, K., Behlke, J., Murayama, K., Saenger, W., Alonso, J.C. and Welfle, H. (2001) Stability and DNA-binding properties of the omega regulator protein from the broad-host range *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035. *FEBS Lett.*, **505**, 436–440.
27. Speck, C., Weigel, C. and Messer, W. (1999) ATP- and ADP-dnaA protein, a molecular switch in gene regulation. *EMBO J.*, **18**, 6169–6176.
28. Tullius, T.D. and Dombroski, B.A. (1986) Hydroxyl radical footprinting: high-resolution information about DNA-protein contacts and application to lambda repressor and Cro protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **83**, 5469–5473.
29. Hammes, G.G. (2000) *Thermodynamics and Kinetics for the Biological Sciences*. Wiley-Interscience, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, Canada.
30. Smith, T.L. and Sauer, R.T. (1995) P22 Arc repressor: role of cooperativity in repression and binding to operators with altered half-site spacing. *J. Mol. Biol.*, **249**, 729–742.
31. Smith, T.L. and Sauer, R.T. (1996) Role of operator subsites in Arc repression. *J. Mol. Biol.*, **264**, 233–242.
32. Phillips, S.E., Manfield, I., Parsons, I., Davidson, B.E., Rafferty, J.B., Somers, W.S., Margarita, D., Cohen, G.N., Saint-Girons, I. and Stockley, P.G. (1989) Cooperative tandem binding of met repressor of *Escherichia coli*. *Nature*, **341**, 711–715.
33. Somers, W.S., Rafferty, J.B., Phillips, K., Strathdee, S., He, Y.Y., McNally, T., Manfield, I., Navratil, O., Old, I.G., Saint-Girons, I. et al. (1994) The Met repressor-operator complex: DNA recognition by β -strands. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **726**, 105–117.
34. Dostál, L., Misselwitz, R., Laettig, S., Alonso, J.C. and Welfle, H. (2003) Raman spectroscopy of regulatory protein Omega from *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035 and complexes with operator DNA. *Spectroscopy*, **17**, 435–445.

Role of the N-terminal region and of β -sheet residue Thr29 on the activity of the ω_2 global regulator from the broad-host range *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035

Karin Welfle¹, Florencia Pratto², Rolf Misselwitz¹, Joachim Behlke¹, Juan C. Alonso² and Heinz Welfle^{1,*}

¹Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch, Robert-Rössle-Str. 10, D-13092 Berlin, Germany

²Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, C.S.I.C., E-28049, Madrid, Spain

*Corresponding author
e-mail: welfle@mdc-berlin.de

Abstract

The dimeric regulatory protein wild-type ω (wt ω_2) binds to arrays of 7-bp sequences (heptads) present in the operator DNA region of copy control and partition functions of plasmid pSM19035. Each ω_2 protein probably binds with an antiparallel β -sheet structure in the major groove of the 7-bp subsite of the operator DNA. Exchange of threonine at position 29 to alanine (T29A) drastically affects the activity of variant protein ω_2 T29A both *in vivo* and *in vitro*, and reduces the thermodynamic stability ΔG_u^0 , but does not change the conformation. Likewise, the binding affinity to DNA is reduced and the association of the two monomeric subunits of the ω_2 T29A dimer is weakened, as manifested by an increase in the dissociation constant from 3.2 μM for wt ω_2 to 6.3 μM for ω_2 T29A. Denatured dimers are formed upon thermal unfolding of wt ω_2 and ω_2 T29A at ca. 45 μM ($D_n \leftrightarrow D_u$). Removal of 8 ($\omega_2\Delta\text{N}8$), or even 18 ($\omega_2\Delta\text{N}18$) N-terminal amino acids has no obvious effect either on the core structure or on the activity in comparison to wt ω_2 . The stability of variants $\omega_2\Delta\text{N}8$ and $\omega_2\Delta\text{N}18$ is similar to that of wt ω_2 , and their binding to operator DNA is not impaired.

Keywords: MetJ/Arc superfamily; protein-DNA interaction; protein folding; thermodynamics; transcriptional repressor.

Introduction

Gene regulation in prokaryotes is achieved largely by an even number of protomers of regulatory proteins that specifically interact with palindromic DNA sequences to repress or activate expression of associated genes or groups of genes (Ptashne, 1986). Recognition of arrays of short, direct DNA repeats by specific transcriptional regulators is rare in bacteria (de la Hoz et al., 2000, 2004; Blanco et al., 2002; Kalivoda et al., 2003; Moller-Jensen et al., 2003). Protein ω_2 belongs to the ribbon-helix-helix

(RHH or $\beta\alpha\alpha$) proteins, a growing family of DNA binding proteins, of which several have been studied by X-ray crystallography and NMR spectroscopy (Somers and Phillips, 1992; Raumann et al., 1994; Gomis-Ruth et al., 1998; Schildbach et al., 1999; Murayama et al., 2001; Golovanov et al., 2003; Schreiter et al., 2003). Among the characteristics associated with the DNA-binding domain of dimeric ($\beta\alpha\alpha$)₂ proteins is a two-stranded antiparallel β -sheet that makes sequence-specific contacts with the major groove of DNA, and several residues of the second α -helix (αB) interact with phosphates of the DNA backbone. The β -ribbon of each of the repressors comprises seven to nine amino acid residues per monomer in MetJ, Arc, Mnt, CopG, ParG and NikR (Somers and Phillips, 1992; Raumann et al., 1994; Gomis-Ruth et al., 1998; Schildbach et al., 1999; Golovanov et al., 2003; Schreiter et al., 2003), but only five amino acid residues form the β -ribbon in ω_2 protein monomers (Murayama et al., 2001). MetJ interacts symmetrically with its directly repeated cognate site, whereas the Arc and CopG proteins interact asymmetrically with their palindromic target sites (Somers and Phillips, 1992; Raumann et al., 1994; Gomis-Ruth et al., 1998). Unlike Arc and CopG that interact with one face of the DNA, MetJ and ω_2 protein wrap around the DNA helix (Somers and Phillips, 1992; Raumann et al., 1994; Gomis-Ruth et al., 1998; de la Hoz et al., 2004).

Protein ω_2 is encoded by the low-copy-number, broad-host-range and non-conjugative *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035; the monomer is composed of 71 residues and forms dimers (ω_2) in solution (Misselwitz et al., 2001; Murayama et al., 2001). The ω_2 protein specifically binds with high and similar affinity ($K_{d,\text{app}}$ approx. 20 nM) to two or more unspaced 7-bp (5'-A₁TCAC^A/T-3') DNA heptad repeat units of direct or inverse orientation, but binds with low affinity ($K_{d,\text{app}} > 1 \mu\text{M}$) to a 7-bp subsite or single heptad (de la Hoz et al., 2004). The ω_2 protein specifically interacts with the 5'-TCAC-3' core and/or its complementary 5'-GTGA-3' strand (de la Hoz et al., 2004).

The N-terminal residues methionine 1 (Met1)–alanine 20 (Ala20) of ω_2 are lost by proteolysis during crystallization. Furthermore, Lys21–Asp23 of subunit I and Lys21'–Lys22' of subunit II could not be identified in the electron density map due to disorder (Murayama et al., 2001). The polypeptide chain of ω protein was traced in the X-ray structure from residue Ile24 and Asp23' to the C-termini, respectively. In some members of the RHH family, the N-terminal end is flexible (Golovanov et al., 2003).

The β -strand of ω_2 protein is formed by Lys28 (Lys28')–Val32 (Val32') (Murayama et al., 2001). In the modeled ω_2 -DNA complex, the antiparallel β -ribbon of ω_2

Table 1 Expression *in vivo* of the P_{δ} promoter fused to *lacZ* in the presence of ω variants.

Gene provided <i>in trans</i>	β -Galactosidase activity ^a P_{δ}
None	2260
Vector	1918
$\delta\omega\epsilon\zeta$	55
ω	85
$\omega\Delta 8$	261
$\omega\Delta 18$	202
$\omega\Delta 19$	167
$\omega\Delta 25$	2277
ω T29A	1979

^aActivity specified by P_{δ} in the presence or absence of the product indicated. The β -galactosidase activity is expressed in Miller units. Values are means of at least four separate experiments.

contains Arg31 and Arg31' (corresponding to Arg13 and Arg13' in Arc), the side chains of which are directed toward the DNA major groove and would be able to make asymmetric contacts with guanines (Murayama et al., 2001). Substituting Ala for Arg13 in Arc reduces repressor binding, but Arc mutants with Ala substitutions at the other key β -sheets positions (Glu9 and Asn11) showed a smaller reduction in binding free energy (Brown et al., 1994). However, in MetJ and CopG, Thr residue(s) of each repressor dimer play a relevant role in the recognition of their cognate site(s) (Somers and Phillips, 1992; Gomis-Ruth et al., 1998). To gain insight into the role of the N-terminal amino acids and the Thr side chain that is exposed at the face of the β -sheet of ω_2 protein, we generated ω_2 variants with N-terminal deletions (lacking the first 8, 18, 19 and 25 aa residues of the wt ω_2 sequence) or replaced the solvent-exposed Thr29 by Ala (ω_2 T29A) and characterized the protein variants.

Results

In vivo activity of ω_2 variants

To address the role of the N-terminal region of ω_2 protein, plasmids were constructed bearing the modified ω genes $\omega\Delta 8$, $\omega\Delta 18$, $\omega\Delta 19$ or $\omega\Delta 25$ and encoding N-terminally shortened ω_2 protein variants $\omega_2\Delta N8$, $\omega_2\Delta N18$, $\omega_2\Delta N19$ or $\omega_2\Delta N25$, and the plasmids were transferred into *B. subtilis* $P_{\delta}::lacZ$ competent cells. As shown in Table 1, *in vivo* utilization of P_{δ} is reduced more than 15-fold in the presence of plasmid-borne wt ω gene or ω gene variants $\omega\Delta 8$, $\omega\Delta 18$ and $\omega\Delta 19$. However, the plasmid-borne $\omega\Delta 25$ gene, which renders a protein lacking the first 25 residues, was not able to repress P_{δ} utilization (Table 1).

Site-directed mutagenesis was used to substitute the wt sequence ACG of codon 29 encoding Thr by GCA, resulting in protein variant ω_2 T29A with Ala at position 29. The plasmid-borne ω T29A gene variant was transferred into the *B. subtilis* $P_{\delta}::lacZ$ strain and was not able to repress P_{δ} utilization *in vivo* (Table 1).

Hydrodynamic properties of ω_2 T29A protein

The β -sheet of ω_2 protein that is formed by residues Lys28–Val32 and Lys28'–Val32' is supposed to partici-

pate in the binding of ω_2 to operator DNA (Murayama et al., 2001). The side chain of Thr29 is exposed at the face of the β sheet (Figure 1; Murayama et al., 2001). Gel filtration chromatography on a Superose 12 column was performed at wt ω_2 and ω_2 T29A concentrations of 95 μ M (Figure 2A). At this concentration wt ω_2 should be present in the form of dimers, based on a K_d value of 3.2 μ M (Misselwitz et al., 2001). The peak positions indicated apparent molecular masses of approximately 23 200 Da for wt ω_2 and 20 100 Da for the variant protein ω_2 T29A. These values are much larger than the molecular mass of a monomer (8000 Da), and also significantly larger than the molecular mass of dimers (16 000 Da). The elution behavior could indicate that besides a majority of dimers, tetramers or even higher associates may also exist at the high protein concentrations applied in the experiment. Alternatively, deviations from the globular shape would explain the high apparent molecular masses. The elution peaks of wt ω_2 and ω_2 T29A have an asymmetric shape, with tails to higher elution volumes. The tails suggest partial dissociation of the proteins during the chromatographic run. The larger elution volume of the ω_2 T29A protein points to weaker association of its monomers and to larger K_d value in comparison to wt ω_2 .

Analytical ultracentrifugation (Figure 2B) revealed a concentration-dependent molecular mass in the range of ca. 13 000–14 500 Da. This behavior was similar to that of wt ω_2 protein, which had been interpreted to reflect a monomer-dimer equilibrium with a dissociation constant $K_d=3.2$ μ M (Misselwitz et al., 2001). At a ω_2 T29A concentration as large as 75 μ M the molecular mass of approximately 14 500 Da was lower than that expected for dimers and did not point to the formation of tetramers. For ω_2 T29A a dissociation constant of $K_d=6.3$ μ M was calculated when equilibria between monomers and dimers were assumed. It is likely therefore that this ω_2 variant is mainly a dimer in solution at micromolar protein concentrations and was therefore named ω_2 T29A throughout.

Cross-linking of wt ω_2 and ω_2 T29A

The wt ω_2 and ω_2 T29A proteins in solution were treated with suberic acid-bis(*N*-hydroxysuccinimide) ester and

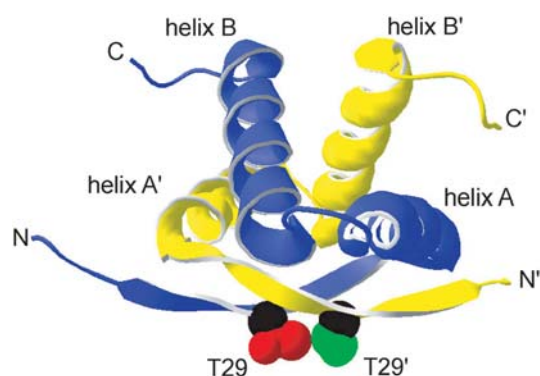


Figure 1 Model of the 3D structure of the wt ω_2 core. The Thr29/29' side chains are shown in the space filling mode; N/N'- and C/C'-terminal ends and helices A/A' and B/B' are labeled. The Figure was prepared with DeepView/Swiss-Pdb-Viewer 3.7 and the atomic coordinates of wt ω_2 (Murayama et al., 2001) from the 1IRQ PDB entry.

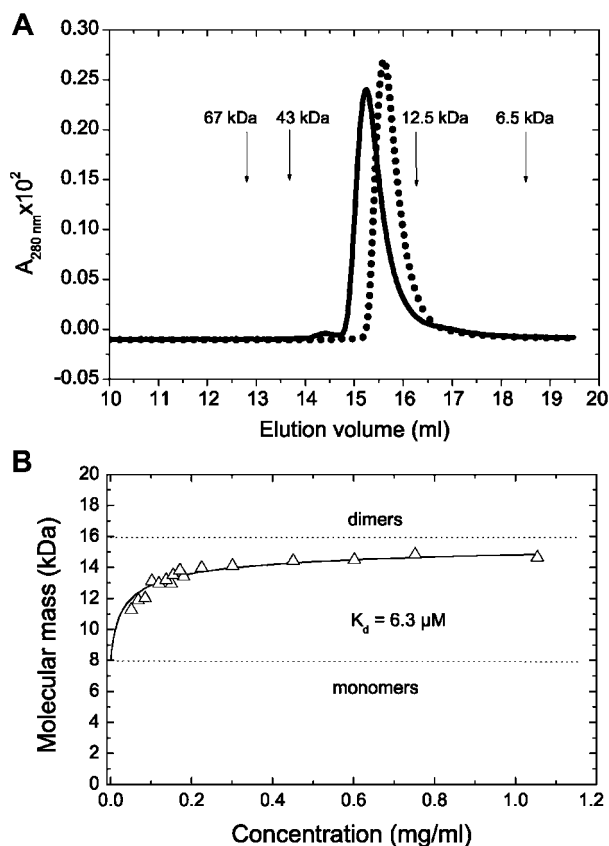


Figure 2 Sedimentation equilibrium and gel filtration measurements of ω_2 T29A.

(A) Elution profiles of 95 μ M ω_2 T29A (dots) and 95 μ M wt ω_2 (solid curve) at 25°C in buffer B. (B) Sedimentation equilibrium analysis of ω_2 T29A in buffer C. The dashed lines indicate the theoretical molecular masses of dimers and monomers. The compact line through the experimental data was calculated assuming a monomer-dimer equilibrium and yielded a dissociation constant $K_d=6.3 \mu$ M.

the reaction mixtures were separated by denaturing SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) (Figure 3). Monomers and dimers were observed at low cross-linker concentrations (Figure 3A,B, lanes 1–4), dimers were the main reaction products at high concentrations of the reagent (Figure 3A,B, lanes 5–8), and at high concentrations of cross-linker, tetramers were also observed in trace amounts for ω_2 T29A (Figure 3B, lanes 6–9) and in larger amounts for wt ω_2 (Figure 3A, lanes 5–9). As expected from the *in vivo* data, similar results were observed with the ω_2 variants $\omega_2\Delta$ N8 and $\omega_2\Delta$ N19 (data not shown).

ω_2 T29A binds non-specifically to DNA

Binding of wt ω_2 , $\omega_2\Delta$ N18 and ω_2 T29A protein as a function of protein concentration to the 66-bp-long [α - 32 P]-HindIII-KpnI DNA fragment V containing three unspaced heptads with the $\rightarrow_2\leftarrow$ orientation was studied using an electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and DNase I footprinting. With both methods, similar apparent dissociation constants ($K_{d,app}$) of ca. 12 nM (de la Hoz et al., 2004) and ca. 30 nM were obtained for the wt ω_2 /fragment V and $\omega_2\Delta$ N18/fragment V complexes, respectively, and two shifted bands were observed for both complexes in the gels, confirming previous results for wt ω_2 /frag-

ment V (de la Hoz et al., 2004). In the case of ω_2 T29A, a 60-fold excess was required to form a protein/DNA complex that was retained on the well (data not shown). The ω_2 T29A protein may form a large protein/DNA aggregate or may interact in a sequence-independent manner with DNA. Proteins ω_2 and $\omega_2\Delta$ N18 protected a discrete region of approximately 28 bp from DNase I attack, as indicated by DNase I footprinting. The protected region extends the 21-bp stretch of the three heptads at the upstream end of the dsDNA (Figure 4A,B), as shown earlier for wt ω_2 (de la Hoz et al., 2004). Similar results were obtained with $\omega_2\Delta$ N19 (data not shown). However, ω_2 T29A failed to protect DNA fragment V from DNase I attack, even in the presence of 250-fold excess of protein (Figure 4C). It is likely, therefore, that the aggregates that were not entering the gel in the EMSA assay were formed by un-specific interactions, perhaps with the DNA backbone.

Conformation and thermal stability monitored by circular dichroism

The circular dichroic (CD) spectra of wt ω_2 , ω_2 T29A, $\omega_2\Delta$ N8 and $\omega_2\Delta$ N18 proteins are very similar (Figure 5A). The CD spectra are dominated by helical characteristics, with double minima at 222 and 208 nm. This finding is confirmed, at least for wt ω_2 , by the three-dimensional structure that was determined by X-ray crystallography (Murayama et al., 2001). Wt ω_2 (Misselwitz et al., 2001) and ω_2 T29A have very similar conformations as shown by almost identical CD spectra (Figure 5A). Deconvolution of the CD spectra using the program VARSLC1 (Johnson, 1990) confirmed the data published earlier (Misselwitz et al., 2001) for wt ω_2 (42% α -helices, 13% β -sheets, 19% turns), and results in similar contents of secondary structure elements for ω_2 T29A (42% α -helices, 9% β -sheets, 23% turns). The CD spectra of $\omega_2\Delta$ N8 and $\omega_2\Delta$ N18 show a small red shift of the zero transitions

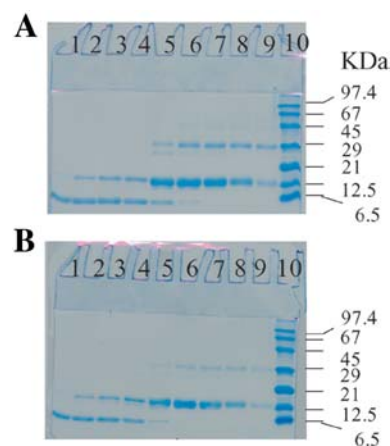


Figure 3 Cross-linking of wt ω_2 (A) and ω_2 T29A (B) with suberic acid-bis(*N*-hydroxysuccinimide) ester.

Both proteins (75 μ M) were incubated with cross-linker for 10 min at 37°C and loaded onto 15% SDS polyacrylamide gels (cross-linker concentrations were 0, 20, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 and 1500 μ M in samples loaded on lanes 1–9, respectively). Lane 10 shows reference proteins: phosphorylase B, 97.4 kDa; bovine serum albumin, 67.0 kDa; ovalbumin, 45.0 kDa; carbonic anhydrase, 29.0 kDa; soybean trypsin inhibitor, 21.0 kDa; cytochrome c, 12.5 kDa; and bovine lung trypsin inhibitor, 6.5 kDa.

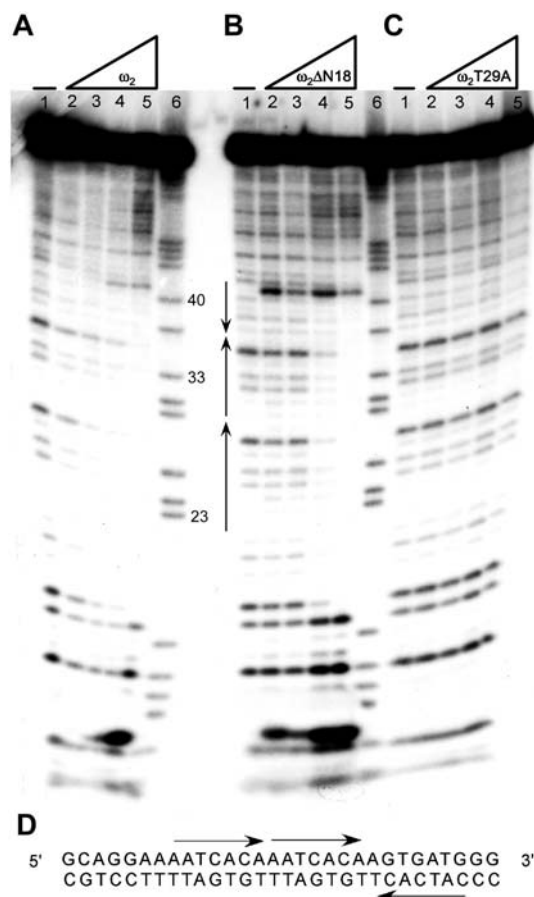


Figure 4 DNase I footprinting experiments of protein-DNA complexes.

The [$\alpha^{32}\text{P}$]-HindIII-KpnI DNA fragment V (labeled at the 3'-end of the bottom strand) containing three heptads was used. The number, location and orientation of the 7-bp repeats is indicated by arrows. [$\alpha^{32}\text{P}$]-DNA (2 nM) and 1 μg of poly[d(I-C)], as non-specific competitor DNA, were incubated with increasing concentrations of wt ω_2 , $\omega_2\Delta\text{N18}$ or $\omega_2\text{T29A}$ in buffer A for 15 min at 37°C, followed by limited digestion with DNase I. The protein concentrations were (A) 0, 7, 15, 30 and 60 nM for wt ω_2 (lanes 1–5) and (B) 0, 10, 20, 40 and 80 nM for $\omega_2\Delta\text{N18}$ (lanes 1–5). The $\omega_2\text{T29A}$ concentrations were (C) 0, 375, 750, 1500 and 3000 nM (lanes 1–5). The G+A lanes (lanes 6 in panels A and B) were obtained by a chemical sequencing reaction (Maxam-Gilbert) and used as a size standard. (D) Sequence of the heptad containing part of DNA fragment V.

and an increase in the negative and positive ellipticity. These spectral changes are consistent with the notion that the omitted N-terminal amino acids are unstructured in the wt ω_2 protein. Quantitative analysis using VARSLC1 is limited by the fact that the spectra are available only up to 193 nm ($\omega_2\Delta\text{N8}$) and 190 nm ($\omega_2\Delta\text{N18}$). Therefore, deconvolution results for $\omega_2\Delta\text{N8}$ (51% α -helices, 2% β -sheets, 23% turns) and $\omega_2\Delta\text{N18}$ (58% α -helices, 8% β -sheets, 16% turns) are reliable for the α -helix content determined but not for the β -structures.

Despite the near identical conformations of wt ω_2 and $\omega_2\text{T29A}$, their thermal stabilities differ greatly (Figure 5B, Table 2). The thermal stabilities of wt ω_2 and $\omega_2\text{T29A}$ were determined using several buffer conditions and protein concentrations by monitoring changes in the ellipticity at 228 nm; similar results were achieved using fluorescence measurements (data not shown). At all conditions tested,

wt ω_2 is more stable than $\omega_2\text{T29A}$ for comparable protein concentrations and buffer conditions (see Tables 2 and 3). The thermal stabilities are strongly protein concentration-dependent. This indicates the existence of monomer-dimer equilibria at low and moderately high protein concentrations. At 4 μM in buffer A, the half-transition temperatures T_m of wt ω_2 and $\omega_2\text{T29A}$ are approximately 50°C and 43°C (Figure 5B, Table 2) and increase to 56°C and ca. 52°C, respectively, at 45 μM (Figure 5C, Table 2).

The thermal stability of the proteins strongly depends on the ionic strength of the buffer (Table 2). Figure 5D illustrates this for 4 μM $\omega_2\text{T29A}$, showing melting curves in buffer A (filled squares), in buffer A with additional 1 M NaCl (open circles), with 2 M NaCl (open triangles), and with 3 M NaCl (crosses). The melting temperatures of 4 μM $\omega_2\text{T29A}$ increased from about 43°C in buffer A to ca. 56°C, ca. 70°C and ca. 73°C in the presence of 1 M, 2 M and 3 M NaCl, respectively (Table 2). At 45.2 μM $\omega_2\text{T29A}$ the melting temperature increased from 52°C in buffer A to 67°C in buffer A+1 M NaCl and approximately 74°C in buffer A+2 M NaCl (Table 2). A similar salt-dependent increase in thermal stability was observed for wt ω_2 , ranging from approximately 50°C in buffer D+0.05 M NaCl to ca. 81°C in buffer D+3 M NaCl (Table 2). The small temperature increment of 2.9°C from 2 to 3 M NaCl for $\omega_2\text{T29A}$ shows that a plateau is reached above approximately 2 M NaCl, whereas for wt ω_2 T_m increases by ca. 8°C in this ionic strength interval. Reversibility of folding increases with increasing salt concentration and is practically complete at 3 M NaCl. The strong dependence of the thermal stability on the ionic strength suggests the existence of disadvantageous, stability-reducing ionic interactions on the surface of wt ω_2 and $\omega_2\text{T29A}$ at low ionic buffer strength. At high ionic strength these interactions might be shielded, and therefore the stability concomitantly increased (Mueller et al., 2000; Perl and Schmid, 2001; Dominy et al., 2002).

Thermal stability: differential scanning calorimetry of wt ω_2 and ω_2 variants

Figure 6 shows a representative differential scanning calorimetric (DSC) melting curve of wt ω_2 ; similar melting curves were obtained for $\omega_2\text{T29A}$, $\omega_2\Delta\text{N8}$ and $\omega_2\Delta\text{N18}$. A remarkable feature is obvious from a comparison of the half-transition temperatures and ΔH values of wt ω_2 and the three variants $\omega_2\text{T29A}$, $\omega_2\Delta\text{N8}$ and $\omega_2\Delta\text{N18}$: variant $\omega_2\text{T29A}$ has a significantly lower T_m value and lower melting enthalpy (termed ΔH_2 in Table 4) compared to wt ω_2 . This is consistent with results of thermal unfolding (described above) and urea-induced unfolding monitored by CD and described below. The result underlines the importance of the single amino acid Thr29 for the stability of wt ω_2 protein. On the contrary, the melting behavior of ω_2 variants with extended N-terminal deletions of 8 and 18 amino acids are identical to wt ω_2 within the error limits of the measurements, i.e., at least 18 N-terminal residues do not contribute to the thermal stability of ω_2 .

The excessive heat capacity curves are characterized by symmetric peaks, suggesting that dissociation phenomena do not contribute remarkably to the melting process at the concentration of the DSC experiments

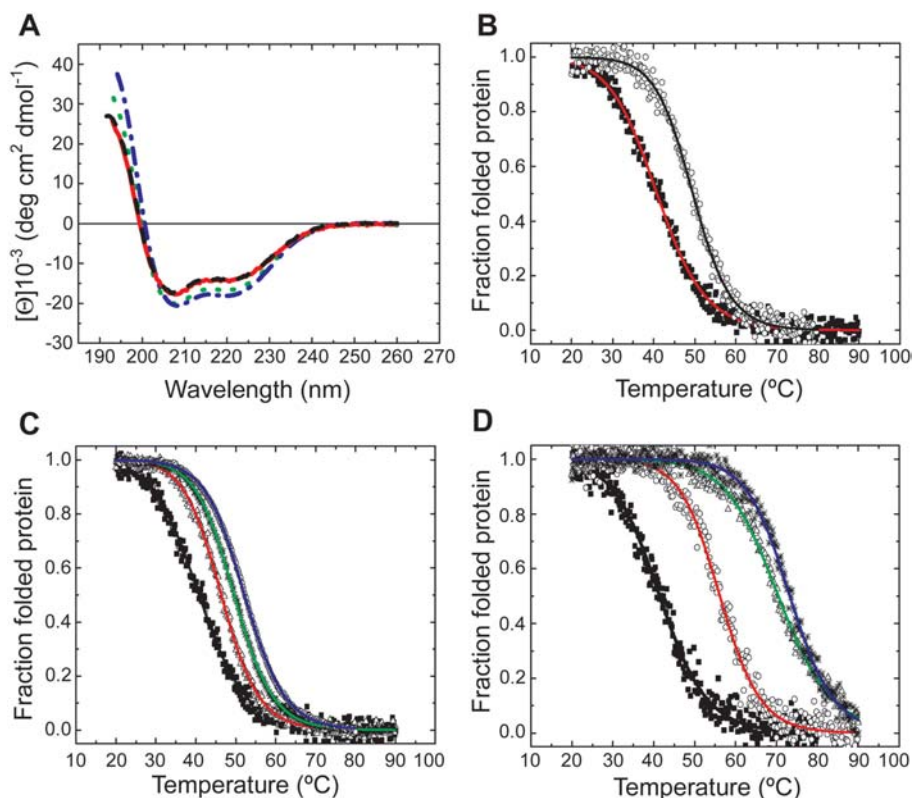


Figure 5 Far-UV CD spectra and thermal stability curves of wt ω_2 and ω_2 variants.

(A) CD spectra of wt ω_2 (46.3 μM ; red, solid spectrum), $\omega_2\text{T29A}$ (45.2 μM , black dashes), $\omega_2\Delta\text{N8}$ (69.1 μM , green dots) and $\omega_2\Delta\text{N18}$ (41.4 μM , blue dashes-dots) in buffer A. (B) Thermal-induced unfolding in buffer A at 4.0 μM wt ω_2 (black line, open circles) and 4.0 μM $\omega_2\text{T29A}$ (red line, filled squares). (C) Concentration dependence of $\omega_2\text{T29A}$ melting in buffer A at 4.0 μM (black line, closed squares), 9.4 μM (red line, open triangles), 20 μM (green line, asterisks) and 45.2 μM (blue line, open circles) with T_m values of ca. 43°C, ca. 46°C, ca. 50°C and ca. 52°C, respectively. (D) Ionic strength dependence of the thermal unfolding of 4.0 μM $\omega_2\text{T29A}$ in buffer A (black line, closed squares), and in buffer A plus 1 M NaCl (red line, open circles), 2 M NaCl (green line, open triangles) and 3 M NaCl (blue line, asterisks). The solid lines in panels B–D represent fits through the normalized experimental data; unfolding was monitored by measuring changes in the ellipticity at 228 nm, and the fractions of folded protein were calculated assuming two-state transitions.

(30–45 μM). The proteins are composed of dimers at the low temperature of the starting conditions and do not seem to dissociate at high temperatures. An asymmetric melting curve would be expected if native ω_2 dimers, D_n , melted into unfolded monomers, M_u , according to model I: $D_n \leftrightarrow 2M_u$. Accordingly, no satisfactory deconvolution of the experimental melting curves was possible for $D_n \leftrightarrow 2M_u$. However, for all proteins studied a reasonable deconvolution in a single two-state transition was obtained when model II, $D_n \leftrightarrow D_u$, was applied, i.e., the melting of native dimers, D_n , into denatured dimers, D_u . T_m and ΔH values for the unfolding reactions, as measured by DSC, are summarized in Table 4.

More complicated pathways are possible that cannot be distinguished by the DSC experiments. For the analysis we assumed that native dimers D_n unfold into denatured dimers D_u without the formation of intermediate states, utilizing interactions that are pre-built in the native state. However, the data do not exclude the possibility that the protein forms folded and unfolded monomers, M_n , and M_u , as little-populated intermediates of the unfolding reaction according to $D_n \leftrightarrow 2M_n \leftrightarrow 2M_u \leftrightarrow D_u$,

and that unfolded monomers associate to D_u by utilizing new, entirely different interactions.

Urea-induced unfolding of wt ω_2 and $\omega_2\text{T29A}$

Urea-induced unfolding was measured under several buffer conditions and protein concentrations, as summarized in Table 2, by monitoring changes in the ellipticity at 220 nm (Figure 7). Wt ω_2 and $\omega_2\text{T29A}$ do not contain tryptophan, so changes in the weak tyrosine fluorescence at 302 nm were monitored. Results for tyrosine fluorescence and CD measurements of $\omega_2\text{T29A}$ were in good agreement (data not shown). $\omega_2\text{T29A}$ at 45.2 μM in buffer A unfolds at a urea half-transition concentration $c_m = 1.91$ M (Figure 7, filled squares) whereas wt ω_2 unfolds at $c_m = 2.73$ M, approximately 0.8 M higher (Figure 7, open squares). The slopes m of the plots of ΔG_u^0 versus urea concentration differ, depending on the model applied. For 45 μM wt ω_2 the resulting m values are -2.2 and -1.58 kcal mol⁻¹ M⁻¹ for model I and model II, respectively. For 45 μM $\omega_2\text{T29A}$ the slopes were smaller, with

Table 2 Temperature- and urea-induced unfolding of wt ω_2 and ω_2 T29A (CD measurements).

Sample	Unfolding agent	Buffer+NaCl	c_{ω_2} (μM)	$c_{m,\text{urea}}$ (M)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)
wt ω_2	Urea	B	0.7	1.60	–
wt ω_2	Urea	B	5.8	2.26	–
wt ω_2	Urea	D+1.0 M	5.5	3.40	–
wt ω_2	Urea	A	45.0	2.73	–
wt ω_2	Heat	B	0.5	–	45.1
wt ω_2	Heat	B	4.0	–	51.4
wt ω_2	Heat	B	7.5	–	53.7
wt ω_2	Heat	D+0.05 M	4.0	–	49.5
wt ω_2	Heat	D+0.3 M	4.0	–	54.3
wt ω_2	Heat	D+1.0 M	4.0	–	63.4
wt ω_2	Heat	D+2.0 M	4.0	–	72.6
wt ω_2	Heat	D+3.0 M	4.0	–	80.7
wt ω_2	Heat	A	4.0	–	49.9
wt ω_2	Heat	A	28.5	–	55.6
wt ω_2	Heat	A	45.0	–	56.0
ω_2 T29A	Urea	B	5.7	1.50	–
ω_2 T29A	Urea	B	28.7	2.04	–
ω_2 T29A	Urea	A	45.2	1.91	–
ω_2 T29A	Heat	A	4.0	–	42.8
ω_2 T29A	Heat	A	9.4	–	46.4
ω_2 T29A	Heat	A	20.1	–	49.8
ω_2 T29A	Heat	A	45.2	–	52.1
ω_2 T29A	Heat	A+1.0 M	4.0	–	56.2
ω_2 T29A	Heat	A+2.0 M	4.0	–	70.4
ω_2 T29A	Heat	A+3.0 M	4.0	–	73.3
ω_2 T29A	Heat	A+1.0 M	45.0	–	67.1
ω_2 T29A	Heat	A+2.0 M	45.0	–	73.7
wt ω_2 -DNA	Heat	A	4.0	–	55.3
ω_2 T29A-DNA	Heat	A	4.0	–	45.3

Buffer A: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 ; buffer B: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl; buffer D: 50 mM Tris-HCl pH 7.5; DNA: 19-bp fragment I with two heptads in tail-to-tail ($\leftarrow \rightarrow$) orientation (top strand 5'-gcg TGT GAT TAA TCA CA gg-3'); molar protein/DNA ratio was 2:1; $c_{m,\text{urea}}$ urea half-transition concentration.

m values of -1.8 and $-1.33 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ for model I and model II, respectively. Unfolding by urea is reversible, as shown for 5.7 and 45.2 μM ω_2 T29A by the similarity of unfolding and refolding curves (Figure 7). Urea-induced unfolding also depends on the protein concentration,

indicating the existence of equilibria between different conformers of the protein. For ω_2 T29A the urea half-transition concentration increased from 1.50 to 2.04 M for a protein concentration increase from 5.7 to 28.7 μM , respectively (Table 2).

Enthalpy, free energy and heat capacity changes of unfolding

Table 3 summarizes thermal- and urea-induced unfolding experiments and thermodynamic parameters. These experiments were performed in buffer A at protein concentrations of 4–45 μM . The T_m values clearly indicate that variant ω_2 T29A is less thermostable than wt ω_2 when comparable protein concentrations are compared.

For calculation of temperature unfolding enthalpy, ΔH_u^0 , heat capacity change, ΔC_p , unfolding equilibrium constants, $K_{u,1}$ and $K_{u,2}$, and free energy at 25 $^{\circ}\text{C}$, $\Delta G_{u,1}^{0,25}$ and $\Delta G_{u,2}^{0,25}$, it was assumed that in the folded state (at room temperature and in the absence of urea) the proteins form dimers. This assumption was probably not entirely valid at the low protein concentration of 4 μM . This concentration is close to or even below the dissociation constants, $K_d=3.2 \mu\text{M}$ and 6.3 μM for wt ω_2 and ω_2 T29A, respectively, and therefore a significant fraction of the proteins might dissociate. Another uncertainty concerns the reaction product of the unfolding reaction. The formation of unfolded monomers might be expected; however, as described above, analysis of the DSC melting curves strongly points to the formation of unfolded dimers at moderate protein concentrations of 30–45 μM . Therefore, the calculations were performed according to two models, namely model I, assuming the formation of unfolded monomers at low concentrations, $D_n \leftrightarrow 2M_u$, or model II, assuming the formation of unfolded dimers at higher concentrations, $D_n \leftrightarrow D_u$.

Thermal-induced melting curves enable direct access to reaction constants and free energies of unfolding in a limited region close to the transition temperature when correct assumptions were applied. Calculation of the $\Delta G_{u,1}^{0,25}$ and $\Delta G_{u,2}^{0,25}$ values given in Table 3 and application of the Gibbs-Helmholtz Eqs. (8) and (10) for calculation

Table 3 Thermal and urea-induced unfolding of wt ω_2 and ω_2 T29A.

Sample	Unfolding agent	c_{ω_2} (μM dimer equivalents)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta H_{u,T_m}^0$ (kcal mol^{-1})	Model I		Model II	
					$\Delta G_{u,1}^{0,25}$ (kcal mol^{-1})	$K_{u,1}$ (M)	$\Delta G_{u,2}^{0,25}$ (kcal mol^{-1})	$K_{u,2}$ (M)
wt ω_2	Heat	4	49.9	70.9	11.1	7×10^{-9}	–	–
wt ω_2	Heat	29	55.6	48.7	–	–	3.5	3×10^{-3}
wt ω_2	Heat	45	56.0	48.0	–	–	3.5	3×10^{-3}
wt ω_2	Heat	45 _{0.5 M} *	53.9	46.5	–	–	–	–
wt ω_2	Heat	45 _{0.75 M} *	51.7	45.2	–	–	–	–
wt ω_2	Heat	45 _{1.0 M} *	49.6	43.8	–	–	–	–
wt ω_2	Heat	45 _{1.5 M} *	46.5	40.9	–	–	–	–
wt ω_2	Urea	45	–	–	11.7	3×10^{-9}	4.3	1×10^{-3}
ω_2 T29A	Heat	4	42.8	53.3	9.3	2×10^{-7}	–	–
ω_2 T29A	Heat	45	52.1	41.7	–	–	2.7	1×10^{-2}
ω_2 T29A	Urea	45	–	–	9.0	2×10^{-7}	2.6	1×10^{-2}

Unfolding was monitored by CD measurements. T: temperature; buffer was 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 ; $\Delta G_{u,1}^{0,25}$ values were calculated for unfolding model I, $D_n \leftrightarrow 2M_u$; $\Delta G_{u,2}^{0,25}$ values were calculated for unfolding model II, $D_n \leftrightarrow D_u$; $\Delta C_p=0.73 \pm 0.05 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ for wt ω_2 determined at 45 μM . *Subscript values indicate urea concentrations.

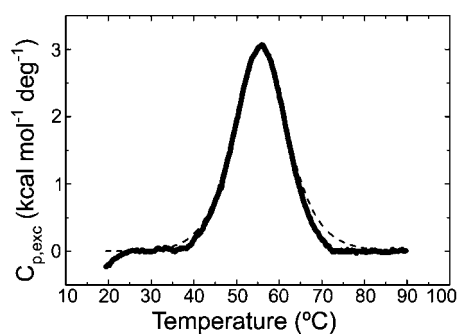


Figure 6 Differential scanning calorimetry of wt ω_2 . The experimental excessive heat capacity curve of 45.2 μM wt ω_2 in buffer A is shown by the thick line, and the dotted line indicates the result of deconvolution assuming a two-state transition.

of the temperature dependence of ΔG_u^0 (Figure 8B) requires knowledge of ΔH_u^0 at T_m and the ΔC_p values. These data were obtained from the thermal-induced melting curves: enthalpy changes ΔH_u^0 (Table 3) were obtained from the slopes of van't Hoff plots; and ΔC_p values resulted from the slopes of ΔH_u^0 versus T_m plots (Figure 8A).

A ΔC_p value of 0.73 kcal mol $^{-1}$ K $^{-1}$ was determined for wt ω_2 at a protein concentration of 45 μM (Figure 8A). ΔH_u^0 values for the ΔH_u^0 versus T_m plot were obtained from CD temperature unfolding curves measured at urea concentrations between 0 and 1.5 M. The data were evaluated according to model II, assuming the unfolding of native into unfolded dimers.

Unfolding of native dimers into unfolded monomers might occur at low protein concentrations. For this condition we did not determine ΔC_p ; therefore, for calculation of the temperature dependence of ΔG_u^0 at low protein concentration a ΔC_p value of 1.3 kcal mol $^{-1}$ K $^{-1}$ was adapted from Robinson et al. (1997); this value was determined for the thermal denaturation of Arc repressor for the unfolding model I, $D_n \leftrightarrow 2M_u$.

The curves describing the temperature dependence of ΔG_u^0 (Figure 8B) were calculated using the modified Gibbs-Helmholtz equations [Eqs. (8) and (10) in Materials and methods], ΔH_u^0 and T_m values as given in Table 3,

and ΔC_p values of 0.73 and 1.3 kcal mol $^{-1}$ K $^{-1}$. The results strongly depend on the model applied (Table 3). This is obvious from a comparison of the free energies calculated according to the two models.

$\Delta G_{u,1}^{0,25}$ values of 11.1 and 9.3 kcal mol $^{-1}$ resulted at low protein concentration with model I ($D_n \leftrightarrow 2M_u$) for wt ω_2 and $\omega_2\text{T29A}$, respectively, when the formation of unfolded monomers was assumed. Much lower $\Delta G_{u,2}^{0,25}$ values resulted according to model II, $D_n \leftrightarrow D_u$: 3.5 kcal mol $^{-1}$ for wt ω_2 at 29 and 45 μM , and 2.7 kcal mol $^{-1}$ for $\omega_2\text{T29A}$ at 45 μM when the formation of unfolded dimers was assumed (Table 3). Similar $\Delta G_{u,2}^{0,25}$ values of 3.7 and 2.7 kcal mol $^{-1}$ were calculated from DSC measurements for wt ω_2 and $\omega_2\text{T29A}$, respectively.

Unfolding of wt ω_2 and $\omega_2\text{T29A}$ by urea probably yields unfolded monomers. However, the formation of denatured dimers is not excluded at high protein concentrations, since the effects of urea on potential interactions between denatured monomers are not known. Therefore, for high (45 μM) protein concentrations the urea unfolding curves were analyzed using model I, $D_n \leftrightarrow 2M_u$, and model II, $D_n \leftrightarrow D_u$, and the data are shown in Table 3 and Figure 8B. Comparison with the results of thermal unfolding does not allow discrimination between these possibilities.

Binding to DNA increases the thermal stability of ω_2 and $\omega_2\text{T29A}$

The thermal stabilities of wt ω_2 /DNA and $\omega_2\text{T29A}$ /DNA complexes were determined by monitoring the ellipticity at 228 nm (Figure 9A). Both proteins were more stable in the complex with DNA compared to the free form. In the complex, the half-transition temperatures, T_m , of wt ω_2 and $\omega_2\text{T29A}$ were ca. 55°C and ca. 45°C, respectively (Table 2).

Figure 9B shows the DSC melting curve of wt ω_2 complex with the 19-bp fragment II and Figure 9C shows that of the 19-bp fragment II alone. The excessive heat capacity curves are representative of further experiments that are listed in Table 4. DSC measurements of wt ω_2 /DNA and $\omega_2\text{T29A}$ /DNA complexes revealed higher stability of the bound proteins in comparison to the free proteins. The melting curves of the complexes were

Table 4 Differential scanning calorimetry of ω_2 , ω_2 variants and ω_2 /DNA complexes.

Sample	$T_{m,1}$ (°C)	ΔH_1 (kcal mol $^{-1}$)	$T_{m,2}$ (°C)	ΔH_2 (kcal mol $^{-1}$)	$T_{m,3}$ (°C)	ΔH_3 (kcal mol $^{-1}$)	$\Delta G_{u,2}^{0,25}$ (kcal mol $^{-1}$)
wt ω_2	—	—	55.5 \pm 0.3	51.2 \pm 0.2	—	—	3.7
$\omega_2\text{T29A}$	—	—	50.6 \pm 0.3	42.9 \pm 1.7	—	—	2.7
$\omega_2\Delta\text{N18}$	—	—	55.4	51.8	—	—	3.8
$\omega_2\Delta\text{N8}$	—	—	55.1	51.1	—	—	3.7
wt ω_2 ·II	58.0 \pm 0.1	44.7 \pm 2.1	63.4 \pm 0.1	85.7 \pm 1.8	68.7 \pm 0.2	147 \pm 2	—
$\omega_2\text{T29A}$ ·II	59.4	50.3	50.1	57.7	68.3	121	—
I	58.4	46.2	—	—	66.4	89.3	—
II	58.7	46.9	—	—	67.9	99.4	—
III	57.7	45.2	—	—	67.7	96.5	—

Buffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl $_2$; values are given as mean \pm standard deviation; I, 19-bp DNA fragment I, $\leftarrow \rightarrow$; II, 19-bp DNA fragment II, $\rightarrow \rightarrow$; III, 19-bp DNA fragment III, $\rightarrow \leftarrow$; $T_{m,1}$, $T_{m,2}$ and $T_{m,3}$ are half-transition temperatures of the first, second and third transition, respectively, obtained by deconvolution of the melting curves of the protein-DNA complexes; ΔH_1 , ΔH_2 and ΔH_3 are the respective enthalpy changes; $\Delta G_{u,2}^{0,25}$ is the Gibbs unfolding energy of the isolated protein, calculated for model II from the DSC data, and corresponds to the $\Delta G_{u,2}^{0,25}$ values in Table 3 that were calculated from the CD measurements.

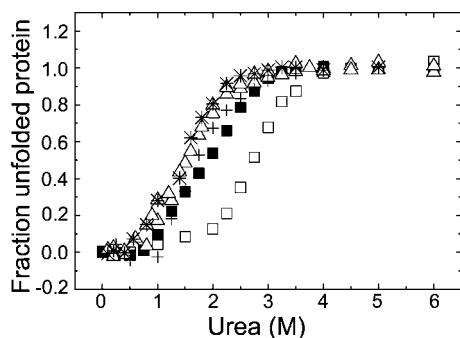


Figure 7 Normalized urea-induced equilibrium unfolding curves.

Unfolding of $45.2 \mu\text{M}$ wt ω_2 (open squares), unfolding (filled squares) and refolding (crosses) of $45.2 \mu\text{M}$ $\omega_2\text{T29A}$ in buffer A, and unfolding (open triangles) and refolding (stars) of $5.7 \mu\text{M}$ $\omega_2\text{T29A}$ in buffer B containing the urea concentrations indicated. The ellipticity at 220 nm was measured at 20°C .

asymmetric with a long tail to lower temperatures and deconvoluted into three two-state transitions. One transition was expected for the melting of wt ω_2 (see Figure 6), and the first and third transitions were considered to be melting transitions of the DNA. To confirm this, free 19-bp fragments were analyzed, and as an example the excessive heat capacity curve of the 19-bp fragment II is shown in Figure 9C. In fact, deconvolution consistently showed two melting transitions for all DNA fragments studied, one broad transition at low temperature and a sharper, large peak at higher temperature, similar to that shown in Figure 9C. This behavior could be repeated for free 19-bp fragment II in a second (or third) unfolding step after cooling of the sample from 90°C to 10°C . The high temperature peak correlates with dissociation of the strands. The significant heat consumption of the low-temperature transition may indicate a pre-melting step. Pre-melting transitions of DNA were attributed to conformational changes of bent DNA (Park and Breslauer, 1991), to unbending of a double-stranded oligonucleotide with a C/ATG doublet step flanking an A-tract at the 5'-end (Nagaich et al., 1994), and to backbone conformational changes of poly(dA)·poly(dT) and poly(dA-dT)·poly(dA-dT) (Movileanu et al., 2002).

In the complex of wt ω_2 with 19-bp fragment II, the half-transition temperature of wt ω_2 was increased by approximately 8°C , i.e., wt ω_2 was thermally stabilized in the complex. Melting of the DNA duplex increased by only 0.7°C . However, the melting enthalpies of both complexes are greater than the sum of the melting enthalpies of proteins and DNA. For wt ω_2 the difference amounts to 80 kcal mol^{-1} , whereas for $\omega_2\text{T29A}$ it is 40 kcal mol^{-1} (Table 4).

wt ω_2 and $\omega_2\text{T29A}$ binding induces different conformational changes in operator DNA

Figure 10 shows CD spectra of the 19-bp fragment II obtained by titration with wt ω_2 (Figure 10A) and $\omega_2\text{T29A}$ (Figure 10B). Figure 10C shows the CD spectrum of the 19-bp fragment II and its spectra in mixtures with increasing concentrations of wt ω_2 . The spectra are shown in the region 250–320 nm, where only DNA, but

not protein, contributes to the CD signal. The 19-bp fragment II was considered to be an appropriate model for the operator DNA binding site of wt ω_2 with directly repeated heptads, and specific wt ω_2 binding was expected. The 19-bp fragment IV has the same base composition as the operator DNA model, but contains an unspecific sequence in the heptad region (top strand sequence 5'-gcg AGT ACT GCT ATA AT gg-3'). As expected, the CD spectra did not indicate significant effects of wt ω_2 on the conformation of operator DNA models (see Figure 10C for 19-bp fragment IV). However, wt ω_2 (Figure 10A) and $\omega_2\text{T29A}$ (Figure 10B) have large effects on the conformation of fragment II. Interestingly, the CD effects of wt ω_2 and $\omega_2\text{T29A}$ were completely different, indicating different binding modes of the two proteins. In the case of wt ω_2 , the positive CD band was blue-shifted and the ellipticity of the 19-bp fragment II at 264 nm successively increased with the addition of

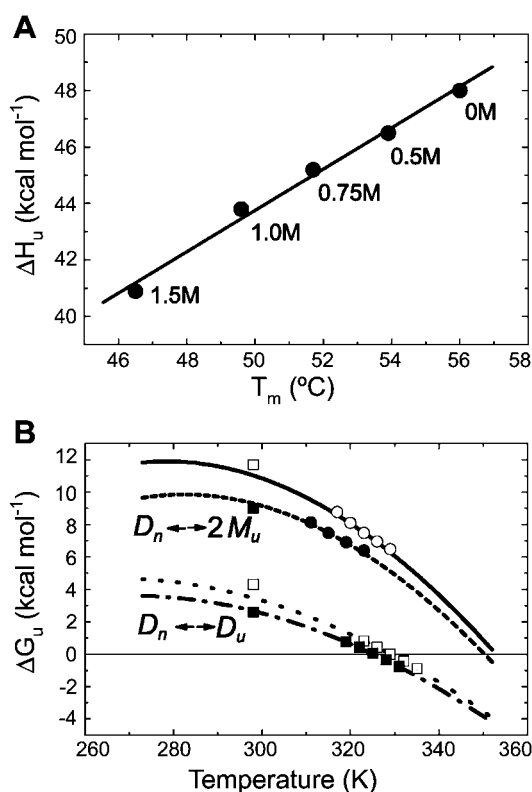


Figure 8 Temperature dependence of the unfolding enthalpy, ΔH_u^0 , and of the unfolding free energy ΔG_u^0 .

(A) Determination of ΔC_p from the slope of a plot of ΔH_u^0 versus T_m , with ΔH_u^0 and T_m values (see Table 3) obtained from the thermal unfolding at $45.2 \mu\text{M}$ wt ω_2 in buffer A containing 0, 0.5, 0.75, 1.0 and 1.5 M urea. From the slope of the line a value for ΔC_p of $0.73 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ was determined. (B) The two upper $\Delta G_u^0(T)$ curves were calculated for $4 \mu\text{M}$ wt ω_2 (solid line) and $4 \mu\text{M}$ $\omega_2\text{T29A}$ (dashes) according to Eq. (8) with ΔC_p , ΔH_u^0 and T_m values from Table 3. The open (wt ω_2) and filled circles ($\omega_2\text{T29A}$) represent the experimental ΔG_u^0 data. The two lower $\Delta G_u^0(T)$ curves were calculated for $45.2 \mu\text{M}$ wt ω_2 (dots) and $\omega_2\text{T29A}$ (dashes-dots) using Eq. (10). The open (wt ω_2) and filled squares ($\omega_2\text{T29A}$) show the experimental ΔG_u^0 data for $45.2 \mu\text{M}$ protein. The ΔG_u^0 values for wt ω_2 (open squares) and $\omega_2\text{T29A}$ (filled squares) plotted at 298 K were calculated for model I and model II from urea unfolding experiments at $45.2 \mu\text{M}$ protein concentration (Table 3). Thermal and urea unfolding experiments were carried out in buffer A.

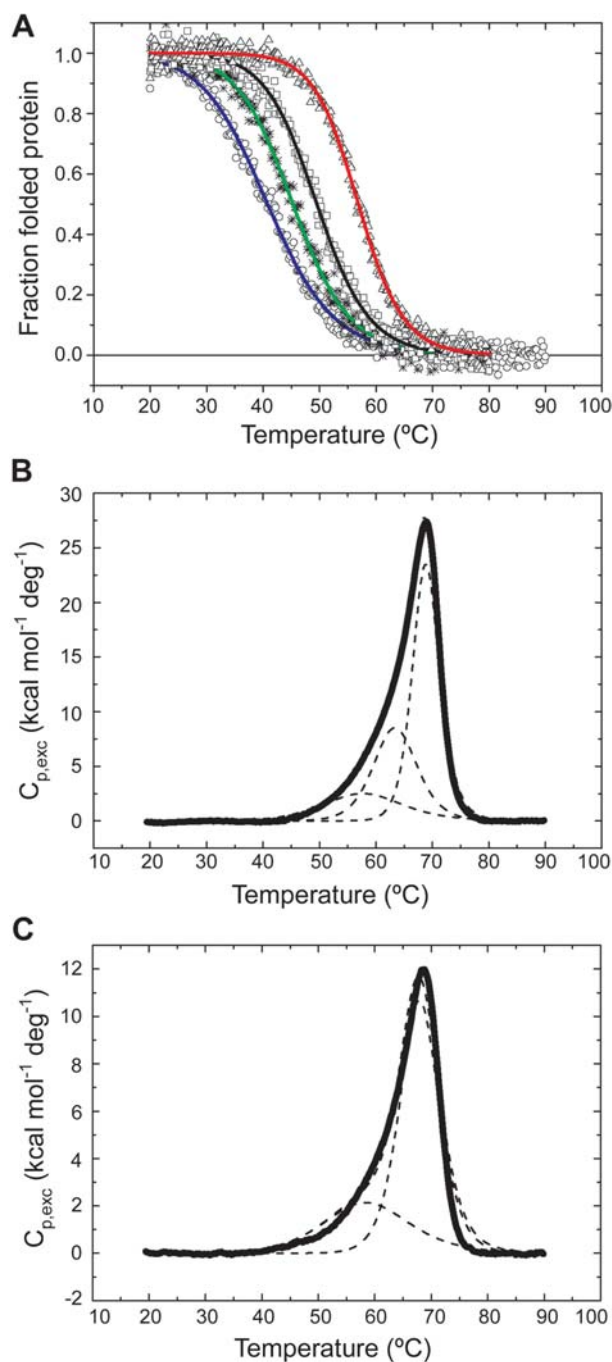


Figure 9 Thermal unfolding of protein-DNA complexes. (A) Normalized thermal unfolding curves of complexes of 4 μM ω_2 T29A (asterisks) and wt ω_2 (triangles) with double-stranded 19-bp DNA fragment I (heptad orientation $\leftarrow\rightarrow$). The complexes were prepared in buffer A by mixing protein and DNA in a 2:1 molar ratio. Changes in the ellipticity were monitored at 228 nm, at which DNA does not contribute to the CD signal. Transition curves of free ω_2 T29A (open circles) and wt ω_2 (open squares) are shown for comparison. The solid lines represent the fits through the normalized experimental data. (B) Excessive heat capacity curve (thick line) of wt ω_2 /DNA fragment II complex. Results of the deconvolution analysis are indicated by thin dashed lines. (C) Excessive heat capacity curve (thick line) of DNA fragment II (top strand sequence 5'-gcg AAT CAC AAA TCA CA gg-3, heptad orientation $\rightarrow\rightarrow$) and deconvolution results (thin dashed lines).

increasing amounts of ω_2 , starting with the first titration step. According to literature data, DNA bends by approximately $50\text{--}60^\circ$ in complexes with MetJ, Arc and CopG (Raumann et al., 1994; Somers et al., 1994; Gomis-Ruth et al., 1998). We propose that DNA bending is reflected by an increase in intensity and a blue shift of the 283-nm maximum in the CD spectra observed upon wt ω_2 binding. However, the effect measured is quite different to the spectral changes induced by histone binding to nucleosomal DNA. Histone binding induces a continuous DNA bending with reduced positive ellipticity without a significant shift of the CD maximum (Olins et al., 1977).

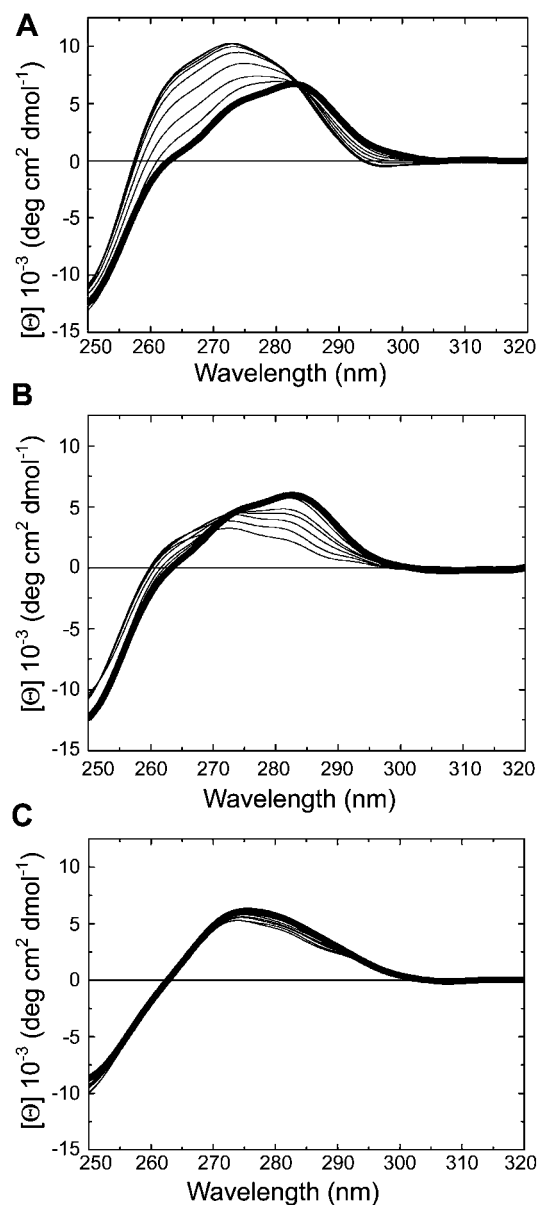


Figure 10 CD spectra of free DNA and wt ω_2 /DNA and ω_2 T29A/DNA complexes.

Titration of DNA fragment II (heptad orientation $\rightarrow\rightarrow$) with increasing amounts of protein: (A) wt ω_2 ; (B) ω_2 T29A; and (C) titration of non-specific DNA fragment IV with wt ω_2 . Fragment IV has the same base composition as DNA fragments I–III, but a random sequence. The samples were in buffer A and the spectra were measured at 20°C at molar DNA/ ω_2 ratios of 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 and 4.0. Thick lines indicate the CD spectra of free DNA.

Possibly, the effects of wt ω_2 on the CD spectra of the operator DNA (Figure 10A) reflect kinking or DNA unwinding in the complex, as discussed for the protein Sox-5/DNA interaction (Connor et al., 1994). A relatively sharp isobestic point was formed at 283 nm, suggesting the presence of two components in the sample, namely a free 19-bp fragment II and wt ω_2 /19-bp fragment II complexes. In contrast, the first three titration steps of ω_2 T29A had no or only a small effect on the CD spectra of the 19-bp fragment II, and with increasing protein/DNA ratio the ellipticity successively decreased, with the most pronounced changes at approximately 283 nm. An isobestic point was not formed, but at approximately 270 nm a broad transition region was observed. The data are consistent with significantly weaker binding of ω_2 T29A, and with the existence of a heterogeneous population of ω_2 T29A/DNA molecules.

Discussion

The experiments described in this paper reveal three points of specific interest: the first concerns the formation of unfolded dimers upon melting of ω_2 ; the second points to the extraordinary importance of Thr29 for the binding of ω_2 to its specific operator DNA binding sites; and the third demonstrates the dispensability of a long N-terminal region of ω_2 , at least under laboratory conditions.

Usually the overall unfolding pathway of a dimeric protein starts with folded dimers (D_n) and ends with two unfolded monomers ($2M_u$) (Gupta et al., 2004). Interestingly, DSC measurements of wt ω_2 and variant proteins ω_2 T29A, ω_2 Δ N18 and ω_2 Δ N8 revealed apparently puzzling unfolding behavior because reasonable fits to the DSC melting curves could not be achieved when unfolded monomers were assumed as reaction products. For a two-state transition from native to unfolded dimers, however, the analysis was straightforward and the fits were in good agreement with the experimental data. The formation of unfolded dimers, D_u , at high protein concentration has drastic consequences on the evaluation of thermal and urea unfolding curves that were monitored by spectroscopic techniques. Results differ greatly, depending on the model applied for data evaluation (Table 3). The free energy of unfolding of ω_2 protein is very small when the formation of dimers is assumed according to $D_n \leftrightarrow D_u$. $\Delta G_{u,2}^{0,25}$ values are similar to those from the DSC measurements. This fact and, by analogy, the results obtained for Arc repressor (Robinson et al., 1997) provide a strong argument for the formation of unfolded dimers, D_u , at high protein concentrations. When unfolding into monomers was assumed and model I, $D_n \leftrightarrow 2M_u$, was used for the calculations, the resulting values for free energy of unfolding, $\Delta G_{u,1}^{0,25}$ are large (Table 3).

$\Delta G_{u,1}^{0,25}$ and $K_{u,1}$, as well as $\Delta G_{u,2}^{0,25}$ and $K_{u,2}$ given in Table 3, are interconvertible using the standard equation of thermodynamics, $\Delta G_u = -RT \ln K_u$. $K_{u,1}$ values are in the nanomolar range, and $K_{u,2}$ in the millimolar range. In a first, very crude approach, this might be considered as a consequence of the fact that for unfolding into denatured dimers the dissociation energy is not consumed. To

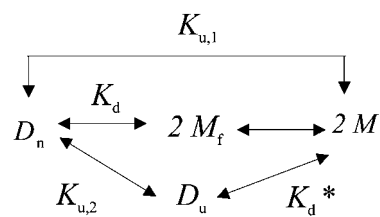


Figure 11 Model for the thermal denaturation of ω_2 .

prove this, using the following considerations we related K_u and ΔG_u^0 values from Table 3 with the dissociation constants K_d determined by analytical ultracentrifugation (Misselwitz et al., 2001). We considered K_d as the constant for the dissociation of native dimers D_n into folded monomers M_f according to $D_n \leftrightarrow 2M_f$, and speculated that the dissociation constant K_d^* for assumed dissociation of unfolded dimers D_u into unfolded monomers M_u has the same value as K_d . If this is valid, the equilibrium unfolding constant $K_{u,1}$ should be the product of $K_{u,2}$ multiplied by K_d ($K_{u,1} = K_{u,2} \cdot K_d$). The same considerations are possible for the free energy changes of the reactions in Figure 11. When K_d is transformed into the free energy change of dissociation ΔG_d , with $\Delta G_{u,1}^{0,25}$ representing the unfolding energy for the formation of unfolded monomers M_u , and $\Delta G_{u,2}^{0,25}$ representing unfolding into denatured dimers D_u , the unfolding free energies are related by $\Delta G_{u,1}^{0,25} = \Delta G_{u,2}^{0,25} + \Delta G_d$.

The K_d and ΔG_d values for wt ω_2 are $K_d = 3.2 \times 10^{-6}$ M and $\Delta G_d = 7.5$ kcal mol $^{-1}$ (Misselwitz et al., 2001); for ω_2 T29A the values are $K_d = 6.3 \times 10^{-6}$ M and $\Delta G_d = 7.1$ kcal mol $^{-1}$ (this work). With these values, and $K_{u,2}$ and $\Delta G_{u,2}^{0,25}$ from Table 3, we calculated for wt ω_2 an equilibrium unfolding constant $K'_{u,1} = 7 \times 10^{-9}$ M and an unfolding free energy $\Delta G'_{u,1} = 11.1$ kcal mol $^{-1}$. The calculated $K'_{u,1}$ and $\Delta G'_{u,1}$ values are similar to the $K_{u,1}$ and $\Delta G_{u,1}^{0,25}$ values given in Table 3 for $D_n \leftrightarrow 2M_u$. For ω_2 T29A an equilibrium unfolding constant of $K'_{u,1} = 2 \times 10^{-7}$ M and a free energy of unfolding of $\Delta G'_{u,1} = 9.3$ kcal mol $^{-1}$ are obtained. The $K'_{u,1}$ and $\Delta G'_{u,1}$ values for wt ω_2 and ω_2 T29A calculated in this way are in reasonably good agreement with the experimental values $K_{u,1}$ and $\Delta G_{u,1}^{0,25}$ given in Table 3 for model I, $D_n \leftrightarrow 2M_u$. This is surprising in view of the assumptions that we made.

The evaluation of urea-induced unfolding demonstrates again the importance of the model applied for the reliability of calculated results (Table 3). When model II ($D_n \leftrightarrow D_u$) was applied, low values were obtained for ΔG_u ; with model I ($D_n \leftrightarrow 2M_u$) the ΔG_u values calculated were large. Whether unfolded monomers or denatured dimers are formed at high urea concentration cannot be decided from our data. Even at high denaturant concentrations, the existence of dimeric proteins is possible, as shown recently for the dimeric protein Sm11p, which at 4.8 M guanidinium chloride is partially unfolded but still dimeric, whereas 7.3 M guanidinium chloride is necessary for unfolding to monomers (Gupta et al., 2004).

For Arc repressor, another member of the RHH family of dimeric proteins, the formation of denatured dimers has been demonstrated (Robinson et al., 1997). At Arc concentrations above 100 μ M, thermal denaturation of Arc is reversible and cooperative. The denatured protein shows significantly reduced secondary structure and no

evidence for a tightly packed core, but light scattering and fluorescence polarization studies indicated the formation of dimers according to $D_n \leftrightarrow D_u$. Obviously the thermal unfolding mechanisms of Arc repressor and ω_2 (and its variants studied here) are strikingly similar.

The *E. coli* histone-like HU protein interacts with the minor groove of DNA via antiparallel β -sheets in a sequence-independent manner. For HU the formation of partially unfolded dimeric intermediates was recently demonstrated during thermal unfolding at temperatures of 50–70°C, depending on the ionic strength of the buffer (Ramstein et al., 2003). At higher temperatures, these intermediates melt into unfolded monomers. The partially unfolded dimers of HU protein are thermally less stable compared to the denatured dimers of ω_2 and Arc repressor; nevertheless, the melting behavior of HU protein provides a further example of the formation of unfolded or at least partially unfolded dimers at high temperatures. This might occur more frequently than anticipated up to now. Non-native dimerization at high temperatures and protein concentrations has a significant effect on protein stability and emphasizes the importance of denatured states on protein stability (Shortle, 1996).

The Thr29 residue is embedded in the β -sheet of ω_2 , which was suspected to insert into the major groove of the operator DNA (Murayama et al., 2001). Exchange of Thr29 to Ala does not change the conformation of the ω_2 T29A protein, but drastically reduces its stability, its DNA binding properties and its effect on the DNA conformation when it forms complexes with operator binding sites. These data clearly demonstrate the extraordinary importance of Thr29 for DNA binding and the formation of specific ω_2 -operator DNA complexes.

Deletion of up to 19 amino acids from the N-terminal end of the ω_2 sequence had a minor or no effect on the conformation of the ω_2 core structure of the resulting variant proteins $\omega_2\Delta N8$ and $\omega_2\Delta N18$. While the $\Delta G_{u,25}^{0,25}$ values of ω_2 T29A were lower, the values for $\omega_2\Delta N8$ and $\omega_2\Delta N18$ were nearly the same as that for wt ω_2 (Tables 3 and 4). Minor CD effects probably reflect the loss of structural properties of the missing N-terminal amino acid stretches, but not conformational changes of the core structure. This assumption is supported by the fact that the thermal stability of $\omega_2\Delta N8$ and $\omega_2\Delta N18$ was not reduced in comparison to wt ω_2 . Furthermore, their binding capability to operator DNA and the *in vivo* repression of the utilization of *bona fide* $P_{\delta}::lacZ$ fusion were not affected. This finding is in good agreement with the features of CopG, another member of the RHH superfamily of proteins. CopG is composed of only 45 amino acids per monomer, which in its dimeric wild-type form functions as a fully active repressor protein (Acebo et al., 1998). Similarly, the functional unit of ω_2 seems to be a core structure composed of two strands of approximately 50 amino acids in length, as identified in the crystal structure (Murayama et al., 2001).

Materials and methods

Chemicals

Ultrapure urea was obtained from ICN Biomedicals, Eschwege, Germany and suberic acid-bis(*N*-hydroxysuccinimide) ester

(DSS) was from Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany. All other chemicals were purchased from Merck, Darmstadt, Germany. Phosphocellulose was from Whatman, Maidstone, UK. Superose 12, SP-Sepharose, heparin-Sepharose and Mono Q were from Amersham Biosciences, Freiburg, Germany.

Buffers: buffer A, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl; buffer B, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl; buffer C, 50 mM sodium phosphate, pH 7.5, 150 mM NaCl; buffer D, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. All buffers were filtered through a 0.22- μ m filter before measurements.

Bacterial strains, plasmids and β -galactosidase assays

Plasmids pT712 $\omega\Delta 8$ and pHP13 $\omega\Delta 8$, pT712 $\omega\Delta 18$ and pHP13 $\omega\Delta 18$, pT712 $\omega\Delta 19$ and pHP13 $\omega\Delta 19$, or pT712 $\omega\Delta 25$ and pHP13 $\omega\Delta 25$ were constructed bearing modified ω genes missing the first 8, 18, 19 and 25 codons of the ω gene, respectively. For this purpose, a DNA fragment bearing the ω gene was appropriately modified *in vitro*. The products were fused to the non-coding region (P_{ω} and the ribosomal binding site) and the Met1 start codon of an ω gene. This position ensures subsequent protein expression from the variant ω genes $\omega\Delta 8$, $\omega\Delta 18$, $\omega\Delta 19$ and $\omega\Delta 25$. The plasmids constructed in this way were transformed into *B. subtilis* strain BG509 ($P_{\delta}::lacZ$, *recA4*) as previously described (de la Hoz et al., 2004). Here the promoter region of a *bona fide* ω target site (5' non-coding region of the δ gene, P_{δ}) was fused to the promoter-less *lacZ* gene ($P_{\delta}::lacZ$) and the fusion was integrated by a double cross-over event into the *amyE* locus of the *B. subtilis* chromosome (de la Hoz et al., 2000).

Plasmids pT712 ω T29A and pHP13 ω T29A bear a modified ω gene that was constructed by site-directed mutagenesis: ACG of wt codon 29, coding for Thr, was exchanged against GCA, which encodes for Ala in the expressed protein variant ω_2 T29A. Plasmid pCB251, which contains three heptads in the $\rightarrow_2\leftarrow$ orientation, was previously described (de la Hoz et al., 2004).

E. coli strain BL21(DE3) bearing the plasmid-borne wt ω gene (pT712 ω) or variant ω genes (pT712 $\omega\Delta 8$, pT712 $\omega\Delta 18$, pT712 $\omega\Delta 19$, pT712 ω T29A, pT712 $\omega\Delta 25$) was used for protein expression and purification. Protein ω_2 T29A has the same sequence as wt ω_2 except for the single amino acid exchange Thr29A. The sequences of all other variant proteins start with Met1, as for ω_2 , but have at position 2 of their sequences either amino acid 9, 19, 20 or 26 of the ω_2 sequence. Provided the variant proteins have conserved Met1, then they are lacking ω residues 2–8, 2–18, 2–19, or 2–25 at the N-terminal end.

For β -galactosidase assays, aliquots of *B. subtilis* BG509 cells bearing the plasmids indicated were grown to OD₆₀₀=0.4–0.6 and centrifuged. The pellets were resuspended, incubated for 5 min with 0.4 mg ml⁻¹ lysozyme at 37°C, and lysed by the addition of Triton X-100 (final concentration 0.08%). Lysates were clarified by centrifugation for 5 min at 12 000 *g*, and β -galactosidase was assayed in the cell lysates as previously described (de la Hoz et al., 2000).

Protein and DNA purification

The wt ω_2 , ω_2 T29A, $\omega_2\Delta N8$, $\omega_2\Delta N18$ and $\omega_2\Delta N19$ proteins were over-expressed and purified towards homogeneity from *E. coli* BL21(DE3) pLysS cells carrying pT712 ω , pT712 ω T29A, pT712 $\omega\Delta 8$ or pT712 $\omega\Delta 18$ genes after induction with isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) and the addition of rifampicin, essentially according to the same protocol as described recently for the preparation of wt ω_2 (Misselwitz et al., 2001). The protein concentrations (mg ml⁻¹) were determined from the absorbance at 276 nm using absorption coefficients of $A_{1\%,1\text{ cm}}=3.64$, 3.63, 4.01 and 4.77 for ω_2 T29A, wt ω_2 , $\omega_2\Delta N8$ and $\omega_2\Delta N18$ proteins, respectively, calculated from the amino acid composition

(<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>). Molar concentrations are given in dimer equivalents.

The DNA samples were prepared and purified as described recently (Dostál et al., 2003; de la Hoz et al., 2004). The 19-bp-long double-stranded (ds) DNAs contain two 7-bp heptads in different orientations flanked by gcg at the 5'-side and gg at the 3'-side. Heptad orientations are for the 19-bp fragment I, tail-to-tail ($\leftarrow \rightarrow$), top strand 5'-gcg TGT GAT TAA TCA CA gg-3'; the 19-bp fragment II, head-to-tail ($\rightarrow \rightarrow$), 5'-gcg AAT CAC AAA TCA CA gg-3'; and the 19-bp fragment III, head-to-head ($\rightarrow \leftarrow$), 5'-gcg AAT CAC ATG TGA TT gg-3'. The 19-bp fragment IV (5'-gcg AGT ACT GCT ATA AT gg-3') has the same base composition as the 19-bp fragments I, II and III, but with a random sequence instead of two heptads. A 66-bp ds DNA fragment V was obtained by cleaving plasmid pCB251 with the HindIII-KpnI restriction enzymes (de la Hoz et al., 2004). The DNA fragment V was purified and the expected sequence was confirmed by sequencing.

The concentrations of the DNA duplexes were determined spectrophotometrically using an extinction coefficient $\epsilon_{260\text{ nm}} = 12\,978\text{ M} \cdot (\text{bp})^{-1}\text{ cm}^{-1}$ calculated from the base composition (Bloomfield et al., 1999).

Analysis of protein-DNA complexes

For CD measurements, proteins and DNA were mixed at a 2:1 molar ratio in buffer A and incubated for 60 min at 20°C. For DSC measurements, the protein-DNA complexes were concentrated in an Amicon-Ultra-4 centrifugal filter device (Millipore, Eschborn, Germany) and gel filtered on a Superdex 200 High-load 16/60 column (Amersham Bioscience). The peak fractions were pooled, concentrated and filtered through a 0.22- μm filter.

For EMSA, gel-purified 66-bp-long [^{32}P]-HindIII-KpnI DNA (2 nm, with three heptads in $\rightarrow_2 \leftarrow$ orientation) was incubated in buffer A with various amounts of wt ω_2 , $\omega_2\text{T29A}$ or $\omega_2\Delta\text{N18}$ and 1 μg of poly [d(I-C)] as non-specific competitor DNA for 15 min at 37°C in a 20- μl final volume, as previously described (de la Hoz et al., 2000, 2004). The mixtures were then separated by electrophoresis on 8% non-denaturing polyacrylamide gels. The gels were run with 0.5 \times Tris-borate-EDTA buffer at 45 V and 4°C, and were dried prior to autoradiography (de la Hoz et al., 2000).

DNase I footprinting was performed as previously described (de la Hoz et al., 2000, 2004). [^{32}P]-HindIII-KpnI DNA fragment V (2 nm) and 1 μg of poly [d(I-C)] as non-specific competitor DNA were incubated in buffer A with various amounts of the wt ω_2 , $\omega_2\text{T29A}$, $\omega_2\Delta\text{N18}$ or $\omega_2\Delta\text{N19}$ proteins in a total volume of 20 μl , and treated with DNase I (de la Hoz et al., 2000, 2004). The samples were resuspended in loading buffer, separated on 15% denaturing polyacrylamide gels, and the gels were then autoradiographed.

Cross-linking of wt ω_2 and $\omega_2\text{T29A}$ proteins

Cross-linking of wt ω_2 and $\omega_2\text{T29A}$ (75 μM) was carried out in 50 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 0.1 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 60 mM NaCl by incubation with increasing concentrations of suberic acid-bis(*N*-hydroxysuccinimide) ester (0–1.5 mM) for 10 min at 37°C. The reactions were stopped with trichloroacetic acid. Protein precipitates were washed with acetone, dried, dissolved in SDS sample buffer and loaded onto 15% SDS polyacrylamide gels.

Circular dichroism and fluorescence measurements

CD spectra in the far-ultraviolet region were measured at 25°C with a Jasco-J720 spectropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japan) using 0.01- and 0.1-cm quartz cuvettes. The mean residue ellipticities [θ] were calculated using mean residue molecular masses

of 112.1, 112.5, 114.8 and 114.7 Da for $\omega_2\text{T29A}$, wt ω_2 , $\omega_2\Delta\text{N8}$ and $\omega_2\Delta\text{N18}$, respectively. The secondary structure content was determined using the variable selection method (program VARSLC1) starting with a set of 33 reference proteins (Johnson, 1990). Fluorescence spectra were obtained at 25°C with a Shimadzu RF 5001 PC spectrofluorimeter (Shimadzu, Kyoto, Japan) using 3-mm quartz cells and an excitation wavelength of 276 nm. The bandwidth of the excitation and emission monochromators was set to 5 nm and the Raman intensity of water was taken as the intensity standard.

For CD titration of the 19-bp DNA fragments I–IV with wt ω_2 and $\omega_2\text{T29A}$, aliquots of concentrated protein solutions in buffer A were added to the desired DNA solutions in a 5-mm-path-length cuvette, mixed, incubated for 15 min at 20°C and measured between 320 and 250 nm.

Thermal unfolding transitions were monitored for free proteins and protein \times DNA complexes in buffers A, B and D at different NaCl concentrations by measuring the ellipticity at 228 nm. At this wavelength protein contributes almost exclusively to the CD signal, whereas the contribution of DNA is very low and can be neglected. Melting curves were recorded at protein concentrations between 0.5 and 45.2 μM in 1- or 0.1-cm cuvettes between 20°C and 90°C at a heating rate of 20°C h $^{-1}$. To control the reversibility of the melting process, CD spectra of heated samples were measured after slow cooling to 20°C.

For urea-induced unfolding, samples were incubated overnight at 4°C, with protein concentrations between 0.7 and 45.2 μM in buffers A or B and varying denaturant concentrations. For refolding experiments, $\omega_2\text{T29A}$ was unfolded overnight in 6 M urea in buffer B, then diluted to the desired urea concentrations and incubated at 4°C for 16 h. The transitions were monitored by measuring the decrease in CD signal at 220 nm and 25°C in a 0.1-cm cell. The increase in fluorescence intensity was measured at 302 nm in a 3-mm cell at an excitation wavelength of 276 nm (5 mm bandwidth for excitation and emission monochromators). The transition curves were analyzed as recently described (Misselwitz et al., 2001).

Differential scanning calorimetry

Measurements were performed using an ultrasensitive VP-DSC scanning microcalorimeter (MicroCal Inc., Northampton, MA, USA). A constant heating rate of 1 K min $^{-1}$ was used in all experiments and protein concentrations were 45 μM . For data analysis and deconvolution the Origin for DSC software package (MicroCal Inc.) was used. The relative error of the values of molar enthalpy change ΔH_m is in the range of $\pm 3\%$ and the absolute error of the transition temperature T_m is $\pm 0.3^\circ\text{C}$. Furthermore, the calorimetric and van't Hoff enthalpy changes ΔH^{cal} and ΔH^{vH} were calculated from the experimental excessive heat capacity curves according to Eqs. (1) and (2), respectively:

$$\Delta H^{\text{cal}} = \int \Delta C_{p,\text{exc}} dT \quad (1)$$

$$\Delta H^{\text{vH}} = \frac{4R(T_{\text{max}})^2}{T_{1/2}} \quad (2)$$

For these calculations the following experimental values were used by the Origin for DSC software: excess heat capacity function, $\Delta C_{p,\text{exc}}$; peak maximum temperature, T_{max} ; and half-width of the transition peak, $T_{1/2}$; R is the gas constant. The ratio between ΔH^{cal} and ΔH^{vH} gives the value κ , which is $\kappa=1$ for two-state unfolding.

Analytical ultracentrifugation and gel filtration

Sedimentation equilibration data for $\omega_2\text{T29A}$ were obtained in an XL-A-type analytical ultracentrifuge (Beckman, Palo Alto, CA,

USA) in buffer C as described in detail recently for ω_2 protein (Misselwitz et al., 2001). Protein concentrations were in the range of 0.05–1.05 mg ml⁻¹. The experimental data were analyzed assuming monomer-dimer equilibria.

Gel filtration experiments were performed at 25°C in buffer B using a Superose 12 column (HR 10/30) (Amersham Biosciences). The column was calibrated in buffer B at 25°C with bovine serum albumin (67.0 kDa), ovalbumin (43.0 kDa), cytochrome c (12.5 kDa) and bovine lung trypsin inhibitor (6.5 kDa).

Calculation of thermodynamic parameters

According to recently published procedures (Pace and Scholtz, 1997), normalized urea- and thermal-induced unfolding curves of f_u , the fraction of unfolded protein versus temperature or urea concentration, were obtained from raw data using Eq. (3):

$$f_u = \frac{F_n - F_{obs}}{F_n - F_u} \quad (3)$$

The spectral signals of the native and unfolded protein, F_n and F_u , were determined from the slope of the pre- and post-transition regions, and F_{obs} is the ellipticity or fluorescence intensity in the transition region at the respective urea concentration or temperature. For further analysis we assumed that ω_2 T29A and ω_2 are dimers. This was reasonable at protein concentrations of ca. 45 μ M, whereas monomers were ignored that are probably present at concentrations of 4–6 μ M (close to the dissociation constants). Two models were considered for analysis of the unfolding reaction: first, transition of dimers into unfolded monomers according to $D_n \leftrightarrow 2M_u$; and second, transition of native dimers into denatured dimers according to $D_n \leftrightarrow D_u$.

Model I: unfolding of native dimers into two unfolded monomers For model I, described by $D_n \leftrightarrow 2M_u$, the unfolding constants, K_u , were determined using Eq. (4):

$$K_u = 2P_t \cdot \frac{f_u^2}{1 - f_u} \quad (4)$$

where P_t is the total protein concentration in monomer units, and f_u is the fraction of unfolded protein. From K_u , the free energy of unfolding, ΔG_u^0 , was calculated according to Eq. (5):

$$\Delta G_u^0 = -RT \ln K_u \quad (5)$$

From thermal-induced unfolding experiments, K_u values around the transition temperature T_m were obtained that were extrapolated to 25°C to give the $K_{u,1}$ values in Table 3. From basic thermodynamics it is known that according to Eq. (6) (van't Hoff equation) the derivative of $\ln K$ with respect to the reciprocal temperature $1/T$ is equal to the enthalpy change $-\Delta H^0$ divided by R , the general gas constant:

$$\frac{d \ln K}{d \left(\frac{1}{T} \right)} = \frac{-\Delta H^0}{R} \quad (6)$$

Plotting $\ln K_u$ versus $1/T$ (van't Hoff plot) allows determination of the enthalpy of unfolding, ΔH_u^0 from the slope of the resulting line, which is equal to $-\Delta H^0/R$. Such calculations are approximate in nature, since a ΔC_p value of zero is assumed for the unfolding reaction. In fact, the heat capacities of folded and unfolded proteins differ. ΔC_p and ΔH are related by Eq. (7):

$$\Delta H^0(T) = \Delta H^0(T^*) + \Delta C_p \cdot (T - T^*) \quad (7)$$

where T^* is any reference temperature and ΔH^0 is the partial

molar enthalpy change at T^* . It follows that the heat capacity change ΔC_p can be calculated from plots of ΔH_u^0 versus melting temperature T_m , where ΔC_p is the slope of the plot. ΔC_p was determined in this way for wt ω_2 using the ΔH_u^0 values obtained in buffer A at urea concentrations between 0 and 1.5 M (see Table 3). We calculated $\Delta G_{u,25}^0$ for 25°C (Table 3) with the modified Gibbs-Helmholtz Eq. (8):

$$\Delta G_u^0(T) = \left(1 - \frac{T}{T_m} \right) \cdot \Delta H_u^0 - R \cdot T \cdot \ln P_t + \Delta C_p \cdot \left[T - T_m - T \cdot \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) \right] \quad (8)$$

using the ΔH_u^0 , T_m and ΔC_p values obtained from thermal unfolding. In addition, ΔG_u^0 versus T curves shown in Figure 8B were calculated with Eq. (8).

Model II: two-state transition between folded and unfolded dimers For model II, described by $D_n \leftrightarrow D_u$, and assuming a 'two-state' transition between folded and unfolded dimers, the equilibrium constant was determined using Eq. (9):

$$K_u = \frac{f_u}{1 - f_u} \quad (9)$$

We calculated ΔG_u^0 using Eq. (5), ΔH_u^0 using Eq. (6), the temperature dependence of the unfolding enthalpy $\Delta H_u^0(T)$ using Eq. (7), and the temperature dependence of the free energy change, $\Delta G_u^0(T)$, using the Gibbs-Helmholtz Eq. (10):

$$\Delta G_u^0(T) = \left(1 - \frac{T}{T_m} \right) \cdot \Delta H_u^0 + \Delta C_p \cdot \left[T - T_m - T \cdot \frac{1}{\ln \left(\frac{T}{T_m} \right)} \right] \quad (10)$$

The urea-induced unfolding experiments immediately yielded $\Delta G_{u,25}^0$ values at 25°C, the temperature of the measurement. ΔG_u^0 values were calculated for model I and model II, plotted against the urea concentration and fitted to Eq. (11):

$$\Delta G_u^0 = \Delta G_{u,H_2O}^0 - m \cdot [\text{urea}] \quad (11)$$

$\Delta G_{u,H_2O}^0$ is obtained by linear extrapolation of the ΔG_u^0 values to 0 M urea, and m is the slope of the plot (Pace and Scholtz, 1997).

Acknowledgments

We thank Brunhilde Kannen for technical assistance during the spectroscopic measurements, and Dr. Wolfram Saenger for providing a clone lacking the first 19 codons of the ω gene. This work was partially supported by EU grant QLK3-CT-2001-00277 to J.C.A. and H.W., BMC2003-00150 from DGICYT to J.C.A., Deutsche Forschungsgemeinschaft grants We 1745/5-1 and We 1745/5-2 to H.W., and a grant from the Spanish Ministerio de Education y Ciencia to H.W.

References

- Acebo, P., Garcia de Lacoba, M., Rivas, G., Andreu, J.M., Espinosa, M., and del Solar, G. (1998). Structural features of the plasmid pMV158-encoded transcriptional repressor CopG, a protein sharing similarities with both helix-turn-helix and β -sheet DNA binding proteins. *Proteins* 32, 248–261.
- Blanco, A.G., Sola, M., Gomis-Ruth, F.X., and Coll, M. (2002). Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure (Camb.)* 10, 701–713.

- Bloomfield, V.A., Crothers, D.M., and Tinoco, I.J. (1999). *Electronic and Vibrational Spectroscopy* (Sausalito, CA, USA: University Science Books).
- Brown, B.M., Milla, M.E., Smith, T.L., and Sauer, R.T. (1994). Scanning mutagenesis of the Arc repressor as a functional probe of operator recognition. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 164–168.
- Connor, F., Cary, P.D., Read, C.M.P., Preston, N.S., Driscoll, P.C., Denny, P., Crane-Robinson, C., and Ashworth, A. (1994). DNA binding and bending properties of the post-meiotically expressed Sry-related protein Sox-5. *Nucleic Acids Res.* **22**, 3339–3346.
- de la Hoz, A.B., Ayora, S., Sitkiewicz, I., Fernandez, S., Pankiewicz, R., Alonso, J.C., and Ceglowski, P. (2000). Plasmid copy-number control and better-than-random segregation genes of pSM19035 share a common regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 728–733.
- de la Hoz, A.B., Pratto, F., Misselwitz, R., Speck, C., Weihofen, W., Welfle, K., Saenger, W., Welfle, H., and Alonso, J.C. (2004). Recognition of DNA by ω protein from the broad-host range *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035: analysis of binding to operator DNA with one to four heptad repeats. *Nucleic Acids Res.* **32**, 3136–3147.
- Dominy, B.N., Perl, D., Schmid, F.X., and Brooks, C.L. III (2002). The effects of ionic strength on protein stability: the cold shock protein family. *J. Mol. Biol.* **319**, 541–554.
- Dostál, L., Misselwitz, R., Laetig, S., Alonso, J.C., and Welfle, H. (2003). Raman spectroscopy of regulatory protein omega from *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035 and complexes with operator DNA. *Spectroscopy* **17**, 435–445.
- Golovanov, A.P., Barilla, D., Golovanova, M., Hayes, F., and Lian, L.Y. (2003). ParG, a protein required for active partition of bacterial plasmids, has a dimeric ribbon-helix-helix structure. *Mol. Microbiol.* **50**, 1141–1153.
- Gomis-Ruth, F.X., Sola, M., Acebo, P., Parraga, A., Guasch, A., Eritja, R., Gonzalez, A., Espinosa, M., del Solar, G., and Coll, M. (1998). The structure of plasmid-encoded transcriptional repressor CopG unliganded and bound to its operator. *EMBO J.* **17**, 7404–7415.
- Gupta, V., Peterson, C.B., Dice, L.T., Uchiki, T., Racca, J., Guo, J.T., Xu, Y., Hettich, R., Zhao, X., Rothstein, R., and Dealwis, C.G. (2004). Sml1p is a dimer in solution: characterization of denaturation and renaturation of recombinant Sml1p. *Biochemistry* **43**, 8568–8578.
- Johnson, W.C. Jr. (1990). Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **7**, 205–214.
- Kalivoda, K.A., Steenbergen, S.M., Vimr, E.R., and Plumbridge, J. (2003). Regulation of sialic acid catabolism by the DNA binding protein NanR in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**, 4806–4815.
- Misselwitz, R., de la Hoz, A.B., Ayora, S., Welfle, K., Behlke, J., Murayama, K., Saenger, W., Alonso, J.C., and Welfle, H. (2001). Stability and DNA-binding properties of the ω regulator protein from the broad-host range *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035. *FEBS Lett.* **505**, 436–440.
- Moller-Jensen, J., Borch, J., Dam, M., Jensen, R.B., Roepstorff, P., and Gerdes, K. (2003). Bacterial mitosis: ParM of plasmid R1 moves plasmid DNA by an actin-like insertional polymerization mechanism. *Mol. Cell* **12**, 1477–1487.
- Movileanu, L., Benevides, J.M., and Thomas Jr., G.J. (2002). Determination of base and backbone contributions to the thermodynamics of premelting and melting transitions in B DNA. *Nucleic Acids Res.* **30**, 3767–3777.
- Mueller, U., Perl, D., Schmid, F.X., and Heinemann, U. (2000). Thermal stability and atomic-resolution crystal structure of the *Bacillus caldolyticus* cold shock protein. *J. Mol. Biol.* **297**, 975–988.
- Murayama, K., Orth, P., de la Hoz, A.B., Alonso, J.C., and Saenger, W. (2001). Crystal structure of ω transcriptional repressor encoded by *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035 at 1.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **314**, 789–796.
- Nagaich, A.K., Bhattacharyya, D., Brahmachari, S.K., and Bansal, M. (1994). CA/TG sequence at the 5' end of oligo(A)-tracts strongly modulates DNA curvature. *J. Biol. Chem.* **269**, 7824–7833.
- Olins, D.E., Bryan, P.N., Harrington, R.E., Hill, W.E., and Olins, A.L. (1977). Conformational states of chromatin nucleosomes induced by urea. *Nucleic Acids Res.* **4**, 1911–1931.
- Pace, C.N. and Scholtz, J.M. (1997). Measuring the conformational stability of a protein. In: *Protein Structure: A Practical Approach*, T.E. Creighton, ed. (Oxford, New York, Tokyo: IRL Press), pp. 299–321.
- Park, Y.W. and Breslauer, K.J. (1991). A spectroscopic and calorimetric study of the melting behaviors of a 'bent' and a 'normal' DNA duplex: [d(GA4T4C)]₂ versus [d(GT4A4C)]₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1551–1555.
- Perl, D. and Schmid, F.X. (2001). Electrostatic stabilization of a thermophilic cold shock protein. *J. Mol. Biol.* **313**, 343–357.
- Ptashne, M. (1986). *A Genetic Switch. Gene Control and Phage Lambda* (Cambridge, UK: Cell Press/Blackwell Scientific Publications).
- Ramstein, J., Hervouet, N., Coste, F., Zelwer, C., Oberto, J., and Castaing, B. (2003). Evidence of a thermal unfolding dimeric intermediate for the *Escherichia coli* histone-like HU proteins: thermodynamics and structure. *J. Mol. Biol.* **331**, 101–121.
- Raumann, B.E., Rould, M.A., Pabo, C.O., and Sauer, R.T. (1994). DNA recognition by β -sheets in the Arc repressor-operator crystal structure. *Nature* **367**, 754–757.
- Robinson, C.R., Rentzeperis, D., Silva, J.L., and Sauer, R.T. (1997). Formation of a denatured dimer limits the thermal stability of Arc repressor. *J. Mol. Biol.* **273**, 692–700.
- Schildbach, J.F., Karzai, A.W., Raumann, B.E., and Sauer, R.T. (1999). Origins of DNA-binding specificity: role of protein contacts with the DNA backbone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 811–817.
- Schreiter, E.R., Sintchak, M.D., Guo, Y., Chivers, P.T., Sauer, R.T., and Drennan, C.L. (2003). Crystal structure of the nickel-responsive transcription factor NikR. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 794–799.
- Shortle, D. (1996). The denatured state (the other half of the folding reaction) and its role in protein stability. *FASEB J.* **10**, 27–34.
- Somers, W.S. and Phillips, S.E. (1992). Crystal structure of the met repressor-operator complex at 2.8 Å resolution reveals DNA recognition by β -strands. *Nature* **359**, 387–393.
- Somers, W.S., Rafferty, J.B., Phillips, K., Strathdee, S., He, Y.Y., McNally, T., Manfield, I., Navratil, O., Old, I.G., Saint-Girons, I., et al. (1994). The Met repressor-operator complex: DNA recognition by β -strands. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **726**, 105–117.

Received March 9, 2005; accepted July 12, 2005

Structures of ω repressors bound to direct and inverted DNA repeats explain modulation of transcription

Wilhelm Andreas Weihofen, Aslan Cicek, Florencia Pratto¹, Juan Carlos Alonso¹ and Wolfram Saenger*

Institut für Chemie und Biochemie/Kristallographie, Freie Universität Berlin, Takustr. 6, 14195 Berlin, Germany and

¹Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, 28049 Madrid, Spain

Received December 20, 2005; Revised and Accepted February 14, 2006

ABSTRACT

Repressor ω regulates transcription of genes required for copy number control, accurate segregation and stable maintenance of *inc18* plasmids hosted by Gram-positive bacteria. ω belongs to homodimeric ribbon-helix-helix (RHH₂) repressors typified by a central, antiparallel β -sheet for DNA major groove binding. Homodimeric ω_2 binds cooperatively to promoters with 7 to 10 consecutive non-palindromic DNA heptad repeats (5'-A/TATCAC^A/T-3', symbolized by \rightarrow) in palindromic inverted, converging ($\rightarrow\leftarrow$) or diverging ($\leftarrow\rightarrow$) orientation and also, unique to ω_2 and contrasting other RHH₂ repressors, to non-palindromic direct ($\rightarrow\rightarrow$) repeats. Here we investigate with crystal structures how ω_2 binds specifically to heptads in minimal operators with ($\rightarrow\rightarrow$) and ($\rightarrow\leftarrow$) repeats. Since the pseudo-2-fold axis relating the monomers in ω_2 passes the central C–G base pair of each heptad with ~ 0.3 Å downstream offset, the separation between the pseudo-2-fold axes is exactly 7 bp in ($\rightarrow\rightarrow$), ~ 0.6 Å shorter in ($\rightarrow\leftarrow$) but would be ~ 0.6 Å longer in ($\leftarrow\rightarrow$). These variations grade interactions between adjacent ω_2 and explain modulations in cooperative binding affinity of ω_2 to operators with different heptad orientations.

INTRODUCTION

Gene expression in prokaryotes is primarily regulated by helix–turn–helix proteins that bind specifically to palindromic operators whereas recognition of arrays of direct or inverted

repeats by transcriptional, homodimeric ribbon-helix-helix (RHH₂) repressors like ω protein is less frequent (1). Structures are known for RHH₂ repressors Arc (2), CopG (3) and MetJ (4) bound to their cognate operators that are bent by 50° to 60°. MetJ₂ binds symmetrically to two to five consecutive 8 bp long palindromic repeats. By contrast, CopG₂ and Arc₂ bind asymmetrically to half sites of palindromic operators that are spaced by 10 and 11 bp, respectively. When bound to these operators, interactions between adjacent RHH₂ contribute to high affinity and cooperative association.

Repressor ω is a global regulator of and encoded by broad-host-range and low-copy number plasmids belonging to the *inc18* family that are stably maintained in Gram-positive bacteria (5–7). ω was originally isolated from *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035 where ω_2 controls promoter regions located upstream of genes involved in plasmid copy number control (*PcopS*), plasmid partitioning (*P δ*) and post-segregational killing (*P ω*) if the plasmid is lost. These promoters comprise arrays of ten, nine or seven consecutive 7 bp repeats (heptads, symbolized by \rightarrow), organized as: *PcopS*, ($\rightarrow\leftarrow\rightarrow\leftarrow\rightarrow\leftarrow\rightarrow\leftarrow\rightarrow$); *P δ* , ($\rightarrow\rightarrow\rightarrow\rightarrow\rightarrow\rightarrow\rightarrow\leftarrow\leftarrow$) and *P ω* , ($\rightarrow\rightarrow\leftarrow\rightarrow\rightarrow\leftarrow\leftarrow$) (1, see Supplementary Figure 9).

Binding of ω_2 to a single heptad or to heptads separated by one or more additional base pair is poor ($k_D > 500$ nM), but tight if operators include at least two consecutive heptads and tightens further with increasing number of heptads. In addition, the affinity depends on heptad arrangement as shown by 6-fold reduced affinity of ω_2 for diverging repeats ($\leftarrow\rightarrow$) ($k_D \sim 120$ nM) compared to heptads in direct ($\rightarrow\rightarrow$) or converging ($\rightarrow\leftarrow$) arrangement ($k_D \sim 20$ nM) (8). Multiple repeat binding sites are also found for eukaryotic operators that interact cooperatively with monomeric and therefore asymmetric transcription factors (1). However, these repeats show different base pair spacings and protein–protein interactions in direct and inverted orientation (9).

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +49 30 838 53412; Fax: +49 30 838 56702; Email: saenger@chemie.fu-berlin.de

Present address:

Wilhelm Andreas Weihofen, Department of Molecular and Cellular Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138, USA

© The Author 2006. Published by Oxford University Press. All rights reserved.

The online version of this article has been published under an open access model. Users are entitled to use, reproduce, disseminate, or display the open access version of this article for non-commercial purposes provided that: the original authorship is properly and fully attributed; the Journal and Oxford University Press are attributed as the original place of publication with the correct citation details given; if an article is subsequently reproduced or disseminated not in its entirety but only in part or as a derivative work this must be clearly indicated. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oxfordjournals.org

In wild type (wt) ω_2 , the N-terminal 20 residues of the 71 residues long ω monomers are probably unstructured as suggested by secondary structure prediction (10) and were cleaved during crystallization ($\Delta 20\omega_2$). The structure features a typical RHH-fold comprising a 2-fold symmetrical β -sheet with antiparallel pairing of residues 28–32 of each monomer followed by α -helices $\alpha 1$ (34–46) and $\alpha 2$ (51–66) (11).

We describe here the crystal structures of an N-terminal deletion mutant (see Results) with 19 residues removed, hereafter $\Delta 19\omega$, in complex with two minimal operators comprising two heptads in ($\rightarrow\rightarrow$) and ($\rightarrow\leftarrow$) arrangement. It was of interest to elucidate the structural determinants for high specificity, affinity and cooperative binding of ω repressor to minimal binding sites and to extrapolate these to natural operators with different heptad arrangements.

Unintentionally, both complexes cocrystallized with free operator DNA. Free ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA allowed us to compare structural changes in DNA induced by repressor binding, whereas free ($\rightarrow\leftarrow$)-DNA was ill-defined in the electron density and could not be fully modeled. The complex between $\Delta 19\omega_2$ and ($\leftarrow\rightarrow$)-DNA dissociated during gel filtration and could not be crystallized.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid construction

For expression of $\Delta 19\omega$ in *Escherichia coli*, wt ω gene missing the first 19 codons was cloned into NcoI–BamHI-cleaved pET28a (Novagen) to render pET28a- $\Delta 19\omega$. The described (1) pHP14-borne ω gene (pHP14 ω) was modified to pHP14 $\Delta 19\omega$ containing promoter P_ω , the ribosomal binding site and the Met start codon fused to codon 20 of ω gene. pHP14 ω mutants pHP14 ω Thr29Ala and pHP14 ω His38Val were generated by site-directed mutagenesis. The plasmids were transferred into *Bacillus subtilis* strain BG511 (P_ω :*lacZ*, *recA4*) as described (1).

β -galactosidase assay

β -galactosidase assays (Table 1) were performed as described (1) except that the centrifuged *B. subtilis* cells were resuspended and lysed by the addition of 0.1% SDS (final concentration 0.0025%) and chloroform.

Preparation of protein–DNA complexes

$\Delta 19\omega_2$ was expressed in *E. coli* according to (1), the cell paste was resuspended in buffer A [50 mM Tris–HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl] and lysed (French Press). The crude extract was processed (1), except that after the phosphocellulose step the fractions were pooled, diluted 5-fold with buffer A and loaded on a POROS 20 HE column (Applied Biosystems). $\Delta 19\omega_2$ was eluted with 50–1000 mM NaCl gradient in buffer A. Concentrated fractions were gel filtrated on Superdex75 (GE Healthcare) run with buffer B [20 mM Tris–HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl].

Complementary oligonucleotides were purified by high-performance liquid chromatography (HPLC), mixed at 1:1 molar ratio, hybridized and purified using a MonoQ column

(GE Healthcare). Eluted DNA was dialyzed against 20 mM Tris–HCl (pH 7.5), 100 mM KCl and 30 mM NaCl. $\Delta 19\omega_2$ was added at 2.1:1 molar ratio and purified by gel filtration (SuperdexS75). Fractions of $\Delta 19\omega_2$ /DNA were concentrated to 10.5 mg/ml for crystallization.

Crystallization

Using hanging-drop vapor diffusion, crystals with space group C2 grew from drops made of 2 μ l of [$\Delta 19\omega_2$] $_2$ -($\rightarrow\rightarrow$) solution or 2 μ l of [$\Delta 19\omega_2$] $_2$ -($\rightarrow\rightarrow$) (bp A9–T6' exchanged by bp G9–C6') solution and 2–3 μ l precipitant solution [150 mM KH_2PO_4 (pH 7.0), 2.4 M Na_2 -malonate, 2% 6-amino-caproic acid].

Crystals of [$\Delta 19\omega_2$] $_2$ -($\rightarrow\leftarrow$) grew in space group P2₁ under similar conditions when precipitant solution contained 150 mM Na/KPO₄ (pH 7.0), 2.4 M Na_2 -malonate and 2 to 3% 2-methyl-2,4-pentanediol. In all cases crystal quality was improved by micro-seeding.

Data collection, structure determination and refinement

X-ray data were collected at 100 K at the Protein Structure Factory beamline BL14.1 of Free University Berlin at BESSY and processed with HKL2K (12); Table 2.

The structure of [$\Delta 19\omega_2$] $_2$ -($\rightarrow\rightarrow$) was determined by molecular replacement in PHASER (13) with $\Delta 20\omega_2$ (PDB code 1IRQ) modeled to 8 bp idealized B-DNA. After manual building of [$\Delta 19\omega_2$] $_2$ -($\rightarrow\rightarrow$) and restrained refinement in REFMAC5 (14), F_o - F_c maps showed additional electron density for another DNA molecule but not for additional $\Delta 19\omega_2$. This second DNA molecule was built manually starting from ideal B-form DNA. In the final model the asymmetric unit consists of one [$\Delta 19\omega_2$] $_2$ -($\rightarrow\rightarrow$) and one free ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA. $\Delta 19\omega$ molecules A' and B could be modeled with all residues 19–71, but A and B' only with residues 23–71 and 25–71, respectively, see Figures 1 and 2 for assignment of A, A', B, B'.

The structure determination of [$\Delta 19\omega_2$] $_2$ -($\rightarrow\rightarrow$) mutant with bp A9–T6' replaced by bp G9–C6' used difference Fourier technique applied to the isomorphous crystal structure of [$\Delta 19\omega_2$] $_2$ -($\rightarrow\rightarrow$), see Table 2.

The structure of [$\Delta 19\omega_2$] $_2$ -($\rightarrow\leftarrow$) was determined in MOLREP (15) using [$\Delta 19\omega_2$] $_2$ -($\rightarrow\rightarrow$) as search model. One [$\Delta 19\omega_2$] $_2$ -($\rightarrow\leftarrow$) was found, and after restrained refinement sparse electron density indicated only four additional bases for free ($\rightarrow\leftarrow$)-DNA that could not be modeled completely, Figure 1B. Molecule B' could be modeled with all residues, B with residues 25–71 and A, A' with residues 22–71.

For refinement of all three structures in Refmac5 TLS groups were assigned and refined for each polypeptide chain and oligonucleotide, see Table 2 for statistics. No non-crystallographic symmetry was used during refinements. Model quality was examined by Whatcheck and Procheck (16) showing that ϕ , ψ torsion angles of most amino acids in all three structures are within the most favored, some are in additionally allowed and none are in forbidden areas of the Ramachandran plot. Figures were generated with MOLSCRIPT (17) and Raster3D (18). Analysis of DNA parameters used program Curves (19).

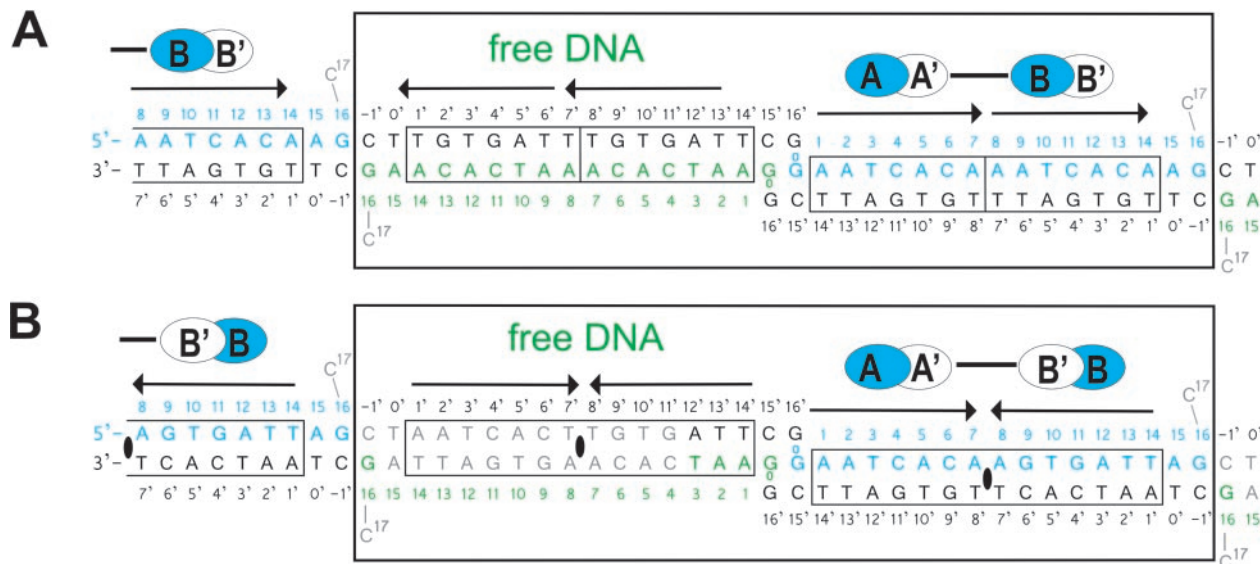


Figure 1. DNA used for cocrystallization and arrangement of (A) $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ and (B) $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ and free DNAs in the crystal asymmetric units (large boxes). Subunits sharing the same protein–DNA interactions $\Delta 19\omega A/B$ shown in blue and $\Delta 19\omega A'/B'$ in white ovals. Solid bars indicate subunits interacting through helices $\alpha 1$, $\alpha 1'$. The pseudo-2-fold axis relating $\Delta 19\omega_2$ and bound heptads in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ indicated by black ellipses in (B). Heptads with sequence 5'-AATCAC^A/T-3' outlined by arrows, and nucleotides are numbered 0 to 17 and $-1'$ to 16', respectively. Top strands of free DNA in green. Grey nucleotides C17 in both structures and 4 to 15 bp of free DNA in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ could not be modeled due to poor electron density.

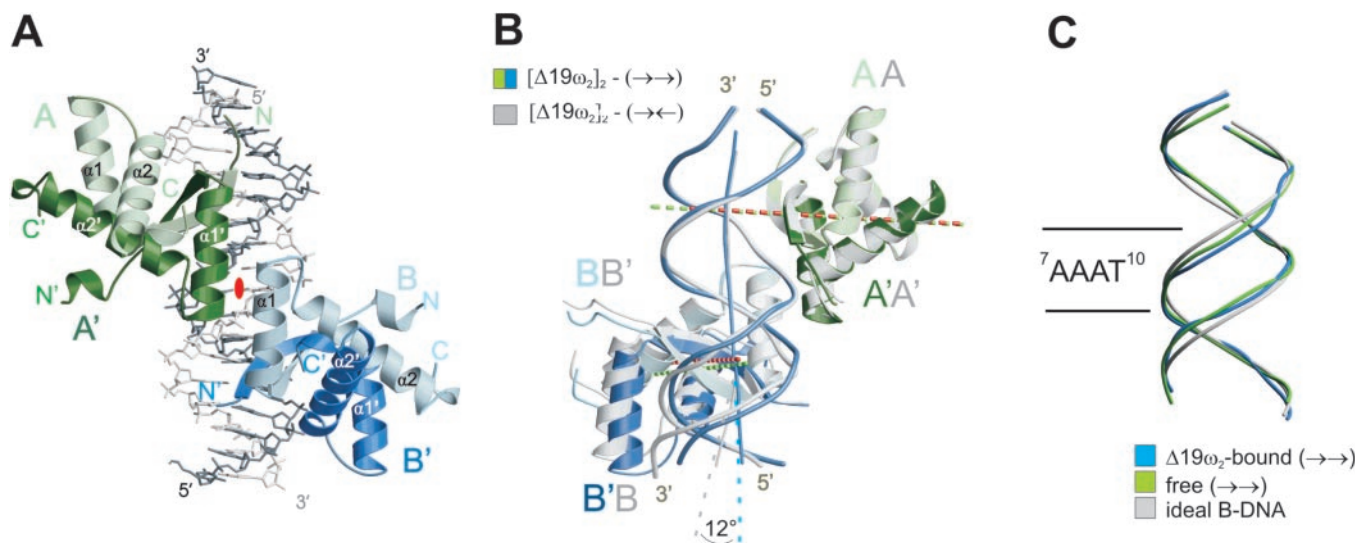


Figure 2. (A) Structure of $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$. DNA backbone trace in light grey for top strand and dark grey for bottom strand, see Figure 1. $\Delta 19\omega$ monomers A/A' and B/B' in light and dark green and blue, respectively, helices $\alpha 1$ and $\alpha 2$ labeled with white letters. Helices $\alpha 1'$ of A' and $\alpha 1$ of B related by a pseudo-2-fold axis perpendicular to the paper plane (red ellipse) form the $\Delta 19\omega_2 \cdots \Delta 19\omega_2$ interface. (B) Superimposition of $\Delta 19\omega A/A'$ of $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ (green) and $\Delta 19\omega A/A'$ of $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ (grey) to show slight positional differences of $\Delta 19\omega B/B'$ associated with palindromic symmetry in $(\rightarrow\leftarrow)$. Pseudo-2-fold axes relating monomers in $\Delta 19\omega_2$ indicated by dashed lines colored green for $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ and red for $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$. Helices $\alpha 1$, $\alpha 1'$ involved in $\Delta 19\omega_2 \cdots \Delta 19\omega_2$ interactions superimpose well allowing cooperative binding in both complexes. DNA in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ is locally kinked by 12° at the centre (bp G11–C4') of heptad A8–T14, and $\Delta 19\omega_2$ are ~ 0.6 Å closer (vertical distance between pseudo-2-fold axes) than in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$, see text. (C) Phosphate backbone of the 14 bp operator regions of operator DNA free $(\rightarrow\rightarrow)$ in green and $\Delta 19\omega_2$ -bound $(\rightarrow\rightarrow)$ in blue superimposed on ideal B-DNA (grey).

RESULTS

$\Delta 19\omega_2$ protein

Cocrystallization of wt ω_2 with operator DNA yielded only crystals with poor X-ray diffraction, but was successful with $\Delta 19\omega$. *In vitro*, $\Delta 19\omega_2$ binds specifically to promoter *PcopS*

with 2-fold lower affinity ($k_D \sim 12$ nM) (see Supplementary Figure 10) compared to wt ω_2 ($k_D \sim 6$ nM) (8), and likewise plasmid-borne $\Delta 19\omega$ gene product represses *P ω* utilization *in vivo* 2-fold weaker compared to wt ω gene (Table 1). This suggests that even without the N-terminal 19 residues, ω_2 still binds strongly (only 2-fold weaker) and

specifically to DNA heptads in both, *in vitro* and *in vivo* gene regulation.

Crystal unit cells contain free and $\Delta 19\omega_2$ bound operator DNA

The crystal structures of $\Delta 19\omega_2$ bound to two minimal operators formed by 17 bp DNAs with C, G overhangs and comprising direct ($\rightarrow\rightarrow$) and inverted ($\rightarrow\leftarrow$) heptads (Figures 1 and 2) were determined by molecular replacement at 2.45 and 2.6 Å resolution, respectively (Table 2). The asymmetric units of both complexes contain two $\Delta 19\omega_2$ bound to operator DNAs ($[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ and $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$) which in turn interact with the ends to free operator DNAs ($\rightarrow\rightarrow$) and ($\rightarrow\leftarrow$), respectively, to form pseudo-continuous DNA (Figures 1 and 3).

On the 'left' sides of free DNA (Figure 1), nucleotides C17 of free and $\Delta 19\omega_2$ -bound DNA are not in helical arrangement and not seen in the electron density as they are disordered but were confirmed by MALDI-TOF-spectrometry of dissolved crystals (data not shown). Both, $[\Delta 19\omega_2]_2$ -bound and free

DNAs, stack with bp G16–C-1' that are related by pseudo-2-fold symmetry.

On the 'right' sides of free DNA (Figure 1), the two 3'-G16' overhangs lie in the minor groove of the adjacent duplex and interact with both 5'-G0 to form two consecutive G16'*(G0–C15') base-triplets (Supplementary Figure 11) with similar geometry as reported (20–22).

In the crystals of $\Delta 19\omega_2$ bound to ($\rightarrow\rightarrow$) in space group C2 and bound to ($\rightarrow\leftarrow$) in space group P2₁ (Table 2), both $[\Delta 19\omega_2]_2$ -DNA complexes interact by protein–protein contacts to form layers parallel to the crystallographic *a*, *b* planes. The crystallographic *a*, *b*-axes in space group P2₁ correspond to *b*, *a*-axes in C2 thus reflecting space group and lattice packing similarities. The pseudo-continuous DNA helices (Figures 1 and 3) are oriented in *c*-direction. The doubled *c*-axis in C2 relative to that in P2₁ is due to the C-centering, and the DNA helices are parallel to the *c*-axis at shortest inter-helix distance of ~ 5 Å in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)\equiv(\rightarrow\rightarrow)$ (base-triplets indicated by \equiv), possibly stabilized by bridging water. By contrast, in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)\equiv(\rightarrow\leftarrow)$ the pseudo-continuous DNA helices are parallel to the crystallographic *a*, *c* plane but inclined at an angle of $\sim 40^\circ$ towards the *c*-axis and at least ~ 8 Å apart, and poor electron density (Figure 3B) indicates that they are partially disordered as shown by B factors >100 Å². Consequently, bp 4 to 15 of free ($\rightarrow\leftarrow$)-DNA in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)\equiv(\rightarrow\leftarrow)$ could not be modeled (Figures 1B and 3B).

In both crystal unit cells (space groups C2 and P2₁, Table 2), the DNA-bound $\Delta 19\omega_2$ show minor structural changes compared to the X-ray structure of free $\Delta 20\omega_2$ (11). This concerns the loop connecting α -helices $\alpha 1$ and $\alpha 2$ [residues 46–48, 2.0 Å root mean square (r.m.s.) deviation for superimposed

Table 1. Utilization of *P ω :lacZ* in the presence of ω variants in *B. subtilis* cells

Gene provided <i>in trans</i>	β -galactosidase activity <i>Pω:lacZ</i>
None	310
pHP14 (control)	298
ω	7
$\Delta 19\omega$	13
ω Thr29Ala	314
ω His38Val	52

The β -galactosidase activity is expressed in Miller units.

Table 2. Crystallographic data and refinement statistics

	$[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)\equiv(\rightarrow\rightarrow)$	$[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)\equiv(\rightarrow\leftarrow)$	$[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)\equiv(\rightarrow\rightarrow)$ A9–T6' replaced by G9–C6'
Space group	C2	P2 ₁	C2
Unit cell parameters (Å)	44.6, 75.0, 219.4	76.0, 42.5, 103.7	44.6, 76.1, 220.0
β (°)	$\beta = 108.8$	$\beta = 107.16$	$\beta = 109.3$
Resolution range (Å)	30.0–2.45	30.0–2.6	30.0–2.9
Observed reflections	83 105	46 759	38 486
Unique reflections	25 244	18 516	14 113
Completeness (%) ^a	97.4 (81.7)	92.8 (72.2)	88.7 (72.1)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ ^a	12.7 (3.0)	11.7 (3.1)	12.1 (2.5)
R_{sym} (%) ^{a,b}	6.4 (38)	11.3 (29)	10.3 (37)
Refinement statistics			
Total atoms	3189	2609	3134
Solvent atoms	72	51	32
R_{work} (%)	22.7	22.5	24.3
R_{free} (%)	26.0	25.9	27.4
Root mean square deviations ^c			
Bond lengths (Å)	0.011	0.009	0.014
Bond angles (°)	1.4	1.1	1.5
B factors (Å ²)	1.6	1.7	1.6
B factors ^d			
$\Delta 19\omega$ A, B, A', B' (Å ²)	41.6, 43.2, 44.8, 40.2	30.8, 32.3, 33.0, 36.4	38.0, 39.7, 37.6, 43.5
$[\Delta 19\omega_2]_2$ -bound DNA (Å ²)	44.1, 41.9	34.9, 34.6	41.4, 38.2
Free DNA (Å ²)	75.8, 82.0	Free DNA incomplete	65.8, 85.3

^aValues in parentheses refer to the outer resolution shell.

^b $R_{\text{sym}} = (\sum |I_{\text{hkl}} - \langle I \rangle|) / (\sum I_{\text{hkl}})$, where I_{hkl} is the observed intensity and $\langle I \rangle$ is the average intensity obtained from multiple observations of symmetry-related reflections.

^cComputed with PROCHECK.

^dAverage B factors calculated for all atoms in each chain.

C α -Atoms] and to a minor extent the β -sheet (residues 27–32, 0.8 Å r.m.s. deviation).

Since gel permeation chromatography of $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ at 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl indicated an apparent molecular mass of 40 kDa (calculated $M_w = 33.4$ kDa), we assume that under crystallization conditions with 2.4 M Na₂-malonate, the complexes associate pairwise through base-triplets G16'*(G0-C15') to form

the complex $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)\equiv(\rightarrow\rightarrow)-[\Delta 19\omega_2]_2$. If one $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ of this complex forms layers mediated by protein-protein contacts as in the present structures, it appears that the other $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ has to release $[\Delta 19\omega_2]_2$ for packing reasons, thereby giving rise to the crystallized $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)\equiv(\rightarrow\rightarrow)$. The other crystal contact with only DNA-DNA stacking interactions is more flexible than the base-triplets and permits formation of a regular crystal lattice. The same crystallization scenario applies for $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$.

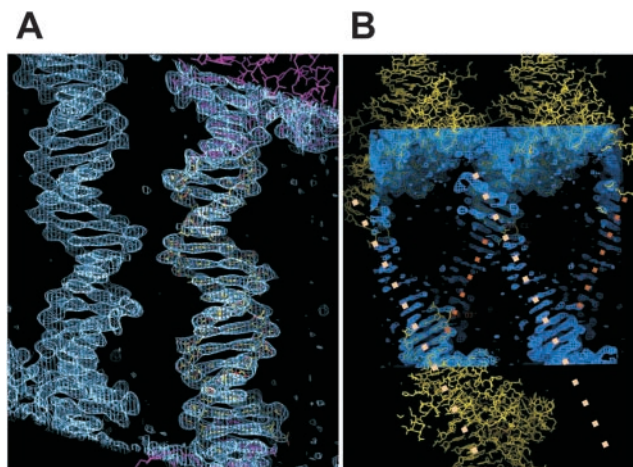


Figure 3. $2F_o-F_c$ electron density distribution contoured at 1.2 σ level; view perpendicular to crystallographic b , c planes with the c -axes vertically oriented. (A) Parallel free DNAs (yellow) in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)\equiv(\rightarrow\rightarrow)$ are at ~ 5 Å shortest distance to each other and stack at both ends with $\Delta 19\omega_2$ -bound DNAs (magenta). Free DNA is not involved in any further crystal contacts. (B) Discontinuous electron density for free DNA in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)\equiv(\rightarrow\leftarrow)$. Modeled complexes of $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ and modeled bases of free DNA (see Figure 1B) in yellow. The central parts of free DNA marked by dotted lines (4 to 15 bp, Figure 1B) could not be modeled due to patchy electron density. The shortest distance between free DNAs is ~ 8 Å and they are at an angle of $\sim 40^\circ$.

Protein-DNA interactions

Formation of G16'*(G0-C15') base-triplets induces distortions at the 5' ends of heptads A1–A7 as indicated by different, partly water-mediated interactions to $\Delta 19\omega_2$ compared to heptads A8–A14 in $(\rightarrow\rightarrow)$ and A8–T14 in $(\rightarrow\leftarrow)$, Figures 4 and 5. For this reason, we focus here on protein-DNA interactions for the less distorted dimer $\Delta 19\omega B/B'$ bound to heptad A8–A14 of $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ (Figures 2A and 4(left)). In both structures, for each $\Delta 19\omega_2$ -bound heptad the direct (not water-mediated) protein-DNA contacts are comparable.

In the major grooves, base pair specific interactions are formed with Thr29 and Arg31 located on the β -sheet. Thr29O γ and Thr29'O γ of $\Delta 19\omega B$ and B' bind specifically to the central bp G4'–C11, and Arg31N ϵ,η hydrogen bond with base G2' (Figure 4(left)). In contrast, the corresponding Arg31' of $\Delta 19\omega B'$ hydrogen bonds with N ϵ' to Thr29O γ of $\Delta 19\omega B$ and with N $\eta 1',\eta 2'$ through three water molecules to bases G4', A5' and A9, Figures 4 and 5.

To see whether $\Delta 19\omega_2$ would bind symmetrically to a palindromic heptad featuring two G to provide both, Arg31 and Arg31', with potential binding partners, we determined the 2.9 Å resolution crystal structure of $[\Delta 19\omega_2]_2$ in complex with a mutated $(\rightarrow\rightarrow)$ where bp A9–T6' was replaced by

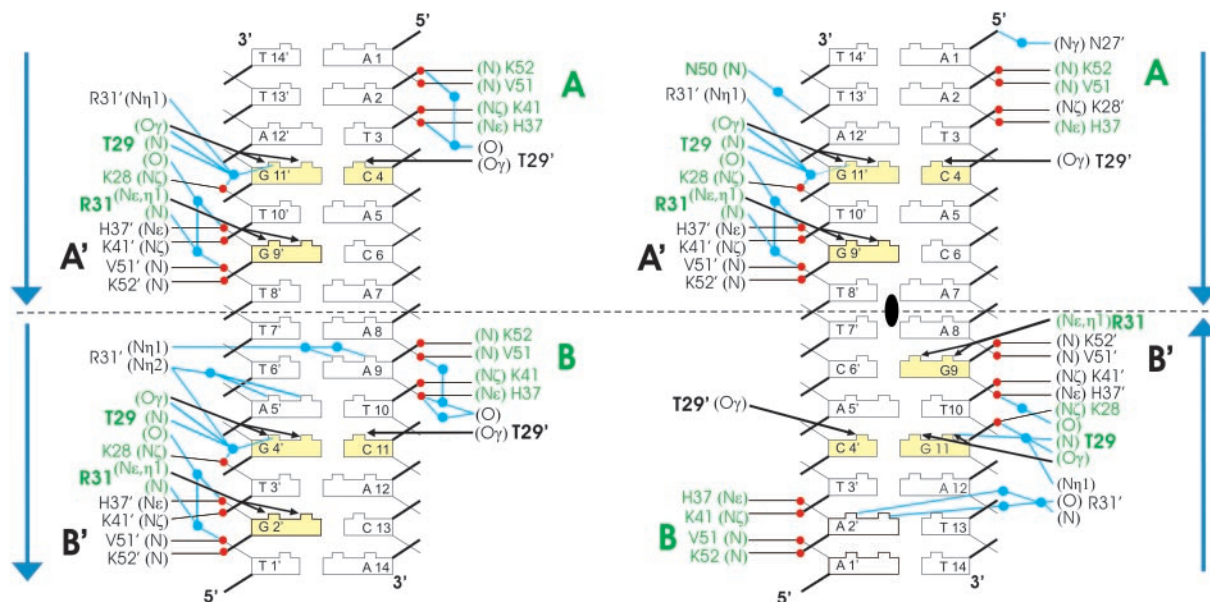


Figure 4. Schematic representation of interactions between $\Delta 19\omega_2$ and DNA in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ (left) and $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ (right). The orientation of heptads is indicated by blue arrows and palindromic symmetry by the black ellipse. Yellow bases specifically interact with $\Delta 19\omega_2$. Residues labeled green for $\Delta 19\omega A/B$ and black for $\Delta 19\omega A'/B'$. Hydrogen bonds to phosphate oxygens (red) in thin black lines, specific hydrogen bonds to bases in the major groove in black arrows, blue lines indicate water (blue dots) mediated hydrogen bonds. K28 (K28') and Arg31 (Arg31') interact differently in subunits A/B and A'/B'.

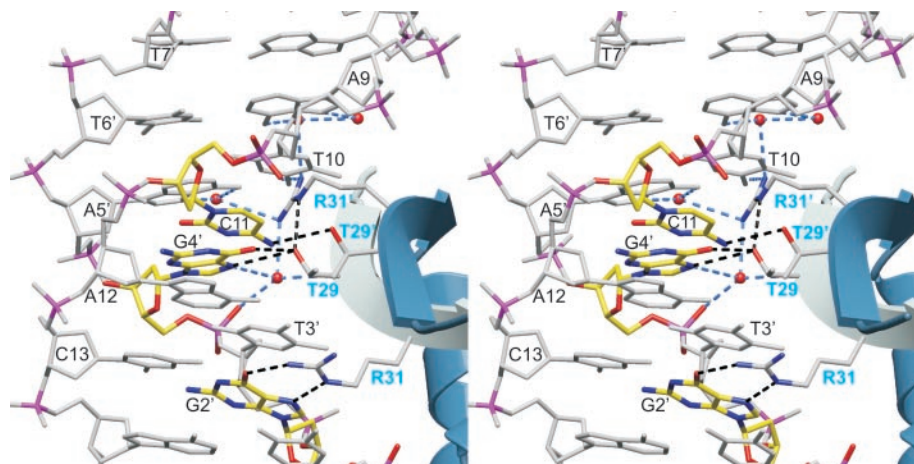


Figure 5. Stereo view of specific interactions between $\Delta 19\omega$ B/B' and bound heptad A8–A14 in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$. Water molecules; red spheres, hydrogen bonds; dashed lines, phosphorus atoms; magenta, directly contacted bp C11–G4' and base G2' in yellow.

G9–C6' (heptad sequence: $^8\text{AGTCACA}^{14}$, Table 2). However, the same interaction pattern was found as in the original heptad. This agrees with similar (2-fold weaker) binding of wt ω_2 to mutated ($\rightarrow\rightarrow$) with the same replacement in the first heptad ($^1\text{AGTCACA}^7$) compared to the original operator (8). A referee suggested to test the binding of $\Delta 19\omega_2$ to heptads with pseudo-palindromic symmetry, 5'-TGTCACA-3'. In view of the binding geometry of $\Delta 19\omega_2$ to $^8\text{AGTCACA}^{14}$, we question whether this would provide novel knowledge. This is because the 5'-AAT- or 5'-AGT-ends of the heptads contact $\Delta 19\omega_2$ in all cases exclusively through unspecific interactions with phosphate groups or are mediated by water molecules (Figure 4A and B). Hence, base pair exchanges in this part of the heptads should not significantly affect binding of $\Delta 19\omega_2$.

Backbone phosphates of all four heptads contact helices $\alpha 1$ and $\alpha 2$ of $\Delta 19\omega$ subunits with pseudo-2-fold symmetry (Figure 4). In $\Delta 19\omega\text{B}$, the 5'-phosphate of A9 caps the N-terminus of $\alpha 2$ by hydrogen bonding to peptide amides of V51 and K52 in a pattern known for RHH₂ proteins and other repressors (4,23), and His37N ϵ , K41N ζ of $\alpha 1$ bind to the 5'-phosphate of T10. Corresponding residues of $\Delta 19\omega\text{B}'$ interact with 5'-phosphates of G2' and T3'. However, K28N ζ located on the β -sheet of $\Delta 19\omega\text{B}$ forms a salt-bridge with the 5'-phosphate of G4' whereas K28'N ζ on $\Delta 19\omega\text{B}'$ is >5 Å away from the corresponding 5'-phosphate of C11.

The asymmetry in the binding of each $\Delta 19\omega_2$ to its particular heptad is reflected by superimposition of C α atoms of monomers (A on A' and B on B', Figure 2A) in each $\Delta 19\omega_2$ showing 0.6 Å r.m.s. deviation partly associated with structural differences in the loops connecting helices $\alpha 1$ and $\alpha 2$ (residues 46–48) and in the β -strands. When $\Delta 19\omega_2$ dimers are superimposed on each other in the same orientation (A on B and A' on B'), i.e. the bound heptads point in the same direction, r.m.s. deviation of only 0.3 Å confirms that all $\Delta 19\omega_2$ -heptad interactions are similar.

Thr29 is essential for specific operator binding

To test the importance of Thr29 for heptad sequence recognition *in vivo* studies were conducted showing that $\omega_2\text{Thr29Ala}$ failed to completely repress promoter P_{ω}

utilization (Table 1). Binding of $\omega_2\text{Thr29Ala}$ to $P_{\omega}\text{copS}$ operator DNA embedded in 300 bp DNA was tested by electrophoretic mobility shift assays (EMSA) (Supplementary Figure 10). Protein–DNA complexes formed with $\Delta 19\omega_2$ but $\omega\text{Thr29Ala}$ required ~ 100 -fold higher concentration (compared to $\Delta 19\omega_2$) that yielded prominent but unspecific binding to $P_{\omega}\text{copS}$ as confirmed by DNase I footprinting (data not shown).

$\Delta 19\omega_2 \cdots \Delta 19\omega_2$ interactions

Protein–DNA interactions in both complexes bury 1610 Å² of solvent accessible surface area. Another 550 Å² are buried by interaction of pseudo-2-fold axis related $\alpha 1$ helices of adjacent monomers A' and B in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ and A' and B' in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$, respectively (Figure 1 and Figure 2A and B). In detail, bifurcated hydrogen bonds between His38N ϵ and Ala45'O/Lys46'O are augmented by hydrophobic contacts between Ile42, Ala45 of both subunits (Figure 6). Positions of His38 and His38' are identical in both complexes whereas the hydrophobic side-chain of Ile42 adopts different rotamers without affecting the size of the buried interface. These interactions ensure cooperative binding when several ω_2 associate with multiple heptad repeats as found in natural operators.

To test the importance of His38, plasmid-borne $\omega\text{His38Val}$ was constructed to remove the bifurcated hydrogen bonds but to maintain the hydrophobic character of the interface. $\omega_2\text{His38Val}$ repressed P_{ω} utilization *in vivo* with ~ 7 -fold lower efficiency than wt ω_2 (Table 1), indicating the important role of His38 for cooperative binding between ω_2 and multiple consecutive heptads.

Conformation of free and $\Delta 19\omega_2$ -bound DNA

The DNAs in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ and $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ are nearly straight B-form with average helical twist of 36° (range 23° to 43°; Supplementary Figure 12), but show distinct features. The major groove width in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ shows strong modulation depending on nucleotide sequence, being ~ 13 to ~ 14 Å except for the $^7\text{AAAT}^{10}$ tract (~ 11 to 12 Å) compared to 11.7 Å for ideal B-DNA (24). In contrast, the major groove width in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ is more continuous (~ 13 to ~ 14 Å) due to the palindromic symmetry (Figure 7A). In the $^7\text{AAAT}^{10}$

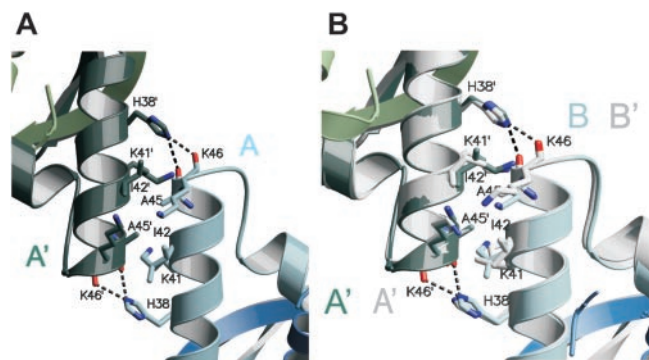


Figure 6. Interactions at the $\Delta 19\omega_2 \cdots \Delta 19\omega_2$ interface (A) between helices $\alpha 1'$ and $\alpha 1$ of subunits A' and B of $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$, (see Figure 2A). The $\Delta 19\omega_2$ are related by a pseudo-2-fold axis perpendicular to the paper plane (red ellipse). Residues with contacts <4 Å to neighbor helix are depicted with side-chains, colors as in Figure 2. Bifurcated hydrogen bonds between His38 (His38') and Ala45O/Lys46O to Ala45'O/Lys46'O of the other subunit in dashed lines. (B) Superimposition as in Figure 2B with view on the dimer-dimer interface to show that dimer-dimer interactions are comparable in both structures.

tract of $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ and in the ${}^7\text{AAGT}^{10}$ tract of $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ the minor groove is narrowed to ~ 2.7 and ~ 4 Å, respectively, compared to 5.7 Å in ideal B-DNA (24) due to an average negative base pair inclination of -8° (Figure 7C), as frequently found for A-tracts (25). This is associated in ${}^7\text{AAAT}^{10}$ of $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ with binding of a single spine of four water molecules, one in each base step as reported in (26). Strong opposite buckles of the C-G bp in the ${}^4\text{CAC}^6$ (-15° , 15°) and ${}^{11}\text{CAC}^{13}$ (-10° , 15°) segments of $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ (Figure 7B) widen the major groove to ~ 13 Å to accommodate the β -sheet, and adjacent (up- and downstream) minor grooves are narrowed (Figure 7A). Similarly, in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ the C-G bp in segment ${}^4\text{CAC}^6$ show comparable buckles of -10° , 19° but in ${}^9\text{GTG}^{11}$ the buckles are reduced to -8° , 5° . Of the four heptads, three feature two subsequent CA steps that are known for their ability to bend B-DNA through positive roll (20,27,28). However, the CA steps do not exhibit unusual structure except for a moderate slide movement of ~ 1 Å at the central C-G bp where $\Delta 19\omega_2$ binds to both bases (Supplementary Figure 12).

In the crystal lattice, free $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA contacts $\Delta 19\omega_2$ -bound $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA with both ends to form pseudo-continuous helices (Figure 1) and is not distorted by any further crystal contacts (Figure 3A). Interestingly, free $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA shows comparable structural features as found for $\Delta 19\omega_2$ -bound $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA (Figure 2C). In the ${}^7\text{AAAT}^{10}$ tract of free $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA, base pair inclination angles are negative, and the minor groove is narrowed to ~ 3.5 Å whereas the major groove is overall widened to an average of 12.5 Å. Additionally, strong opposite buckles are observed for C-G base pair in both CAC segments that are comparable to $\Delta 19\omega_2$ -bound $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA (Figure 7B). These observations suggest that the described significant deviations from ideal B-DNA are a consequence of nucleotide sequence and not induced by binding to $\Delta 19\omega_2$ (Figures 2C and 7).

However, conformational changes upon repressor binding concern base pair parameters helical twist, roll and slide (Supplementary Figure 12). In free $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA these parameters cluster around values assigned to ideal B-DNA, but

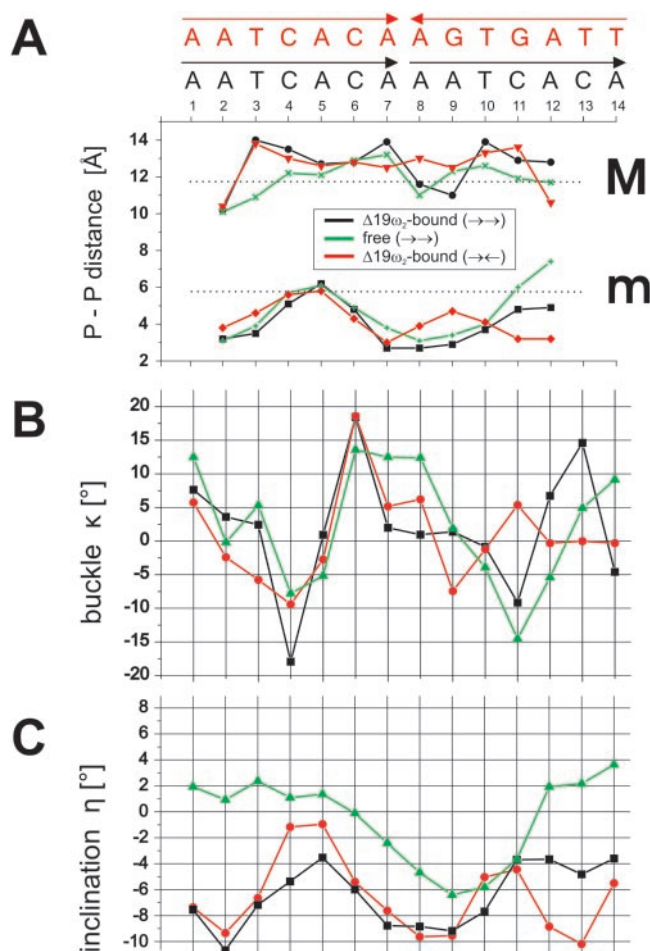


Figure 7. Comparison of operator DNA free and in complex with $\Delta 19\omega_2$. (A) Minor (m) and major (M) groove widths along the central 11 bp of each operator, as measured by shortest P-P distances (less two phosphate group radii, 5.8 Å) indicated by horizontal dotted black lines for ideal B-DNA (24), 5.7 Å and 11.7 Å, respectively. Note minor groove narrowing in the ${}^7\text{AAAT}^{10}$ tract of in $\Delta 19\omega_2$ -bound and free $(\rightarrow\rightarrow)$ DNA and reduced narrowing in ${}^7\text{AAGT}^{10}$ tract of $(\Delta 19\omega_2)_{2-(\rightarrow\leftarrow)}$. (B) Base pair buckle κ (°) and (C) inclination angles η (°) of each operator.

show a negative roll of $\sim -6^\circ$ and positive slide of ~ 1 Å for the central G11'-C4 and G4'-C11 bp of both heptads, and helical twist angles for bp A5-T10' and A12-T3' decrease to $\sim 25^\circ$ in $\Delta 19\omega_2$ -bound $(\rightarrow\rightarrow)$ -DNA. Since these deviations are similar for both heptads of $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ they can be attributed to $\Delta 19\omega_2$ binding. Such comparison is not possible with free $(\rightarrow\leftarrow)$ -DNA as it could not be modeled completely.

Comparison of $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ and $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$

The pseudo-2-fold axis relating the monomers in $\Delta 19\omega_2$ passes with ~ 0.3 Å downstream ($5' \rightarrow 3'$) offset through the central G-C bp of each heptad. Consequently, these symmetry axes are separated by 7 bp in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ but they are 0.6 Å closer in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$, see Figure 2B. Despite the different dimer-dimer separations helices $\alpha 1$ and $\alpha 1'$ forming the $\Delta 19\omega_2 \cdots \Delta 19\omega_2$ interfaces superimpose well in both complexes, consistent with similar dissociation constants ($k_D \sim 20$ nM). In contrast, the separation between the two $\Delta 19\omega_2$ will be ~ 0.6 Å wider in diverging heptads

$[\Delta 19\omega_2]_2-(\leftarrow\rightarrow)$. Assuming that the interaction pattern between $\Delta 19\omega_2$ and heptads with $(\leftarrow\rightarrow)$ orientation is similar as with $(\rightarrow\rightarrow)$ and $(\rightarrow\leftarrow)$ heptad orientations, the expected ~ 0.6 Å longer $\alpha 1\cdots\alpha 1$ contacts are probably less favorable and diminish cooperativity. This agrees with the 6-fold weaker affinity of wt ω_2 to heptads in $(\leftarrow\rightarrow)$ arrangement, the finding that $[\Delta 19\omega_2]_2-(\leftarrow\rightarrow)$ dissociated during gel filtration, and the drastically reduced binding affinity to heptad repeats spaced by one or more additional base pair (8).

Whereas DNA in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ is nearly straight, the superimposition in Figure 2B reveals a kink of $\sim 12^\circ$ at the G11–C4' bp at the centre of the heptad bound to dimer B/B' of $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$. This kink is associated with $\sim 12^\circ$ rotation of dimer B/B' of $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$, the rotational pivot point being located in the $\Delta 19\omega_2\cdots\Delta 19\omega_2$ interface. By virtue of these two motions, the position and orientation of helix $\alpha 1'$ of subunit B' remain almost as in $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ and similar $\Delta 19\omega_2\cdots\Delta 19\omega_2$ interactions explain comparable dissociation constants of both complexes.

Structural model of ω_2 -bound to natural operators

Extrapolation of the structures of $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ and $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$ allowed modeling of $\Delta 19\omega_2$ in complex with natural $P\delta$ promoter (Figure 8). The model implies that wt ω_2 binds as left-handed matrix to right-handed, straight B-type operator DNA, each $\Delta 19\omega_2$ being displaced relative to its neighbor by ~ 7 bp and rotated by 252° . Figure 8B shows that the negatively charged sugar-phosphate backbone of DNA faces positively charged surface of $\Delta 19\omega_2$.

DISCUSSION

Implications of $\Delta 19\omega_2$ -DNA structures for regulation of transcription

The *inc18* family plasmids harbor genes to control their copy number, accurate segregation and stable maintenance during cell division. Since expression of these genes is regulated by the common ω_2 repressor, a unique mechanism has evolved to fine-tune repressor affinity for the different operators. How this is achieved is shown by the present study. It clearly indicates that the pseudo-symmetric ω_2 binds with 0.3 Å downstream ($5'\rightarrow 3'$) offset relative to the center G–C base pair of the cognate heptad. Since the operators are nearly straight B-DNA, different heptad numbers and orientations lead to different distances between $\alpha 1$ helices of adjacent ω_2 , thereby modulating cooperative interactions between ω_2 and different operators. The ability to bind to palindromic as well as to non-palindromic operators is a unique feature of ω_2 and is not shared by other member of the RHH₂ family. We associate this with the interactions between $\Delta 19\omega_2$ that are related by a pseudo-2-fold rotation axis (Figure 2A and Figure 6A and B) so that they interact comparably, no matter what the orientations of adjacent heptads are, $(\rightarrow\rightarrow)$, $(\rightarrow\leftarrow)$ or $(\leftarrow\rightarrow)$. It is unlikely that the deleted N-termini would contribute to $\Delta 19\omega_2\cdots\Delta 19\omega_2$ interactions as the N-termini of $\Delta 19\omega_2$ point away from the $\Delta 19\omega_2\cdots\Delta 19\omega_2$ interface (Figures 2A and 6A).

When RHH₂ bind to DNA, we have to consider two different binding characteristics, the 'variable' binding of flexible side-chains of β -sheets and $\alpha 1$ helices to major groove and phosphate groups, respectively, and 'stiff' capping of N-termini of $\alpha 2$ helices by rigid main-chain NH hydrogen

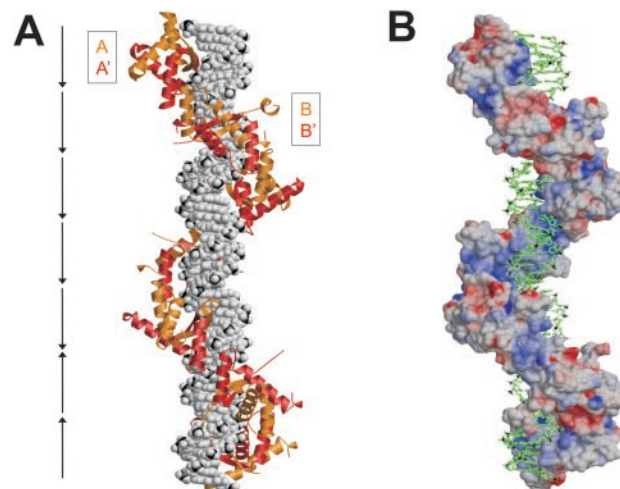


Figure 8. Model of seven $\Delta 19\omega_2$ -bound heptads ($\rightarrow\rightarrow\rightarrow\rightarrow\rightarrow\rightarrow\leftarrow\leftarrow$) of the natural promoter $P\delta$. (A) DNA in space filling and $\Delta 19\omega_2$ as orange/red ribbons, (B) DNA in stick and $\Delta 19\omega_2$ in surface representation colored according to electrostatic potential (negative and positive charges red and blue, respectively). The model is based on the structures of $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\rightarrow)$ and $[\Delta 19\omega_2]_2-(\rightarrow\leftarrow)$. Repressors form a left-handed protein-matrix winding around the nearly straight operator.

bonding to phosphates. Although Arc₂, CopG₂ and MetJ₂ bend minimal cognate operators with two repressor binding sites by 50 to 60°, their cores do not rearrange significantly compared to free repressors and are structurally similar [r.m.s. deviations for superimposed C α atoms 1.0 to 1.5 Å (3)]. In contrast, Arc₂, CopG₂ and MetJ₂ superimpose on DNA-bound $\Delta 19\omega_2$ with higher r.m.s. deviations of 2.3 to 2.8 Å because the β -sheet of $\Delta 19\omega_2$ protrudes ~ 3 Å less from the repressor surface and is closer to the N-termini of helices $\alpha 2$ (Supplementary Figure 13). Due to this geometry of $\Delta 19\omega_2$, the N-termini of helices $\alpha 2$ are in the correct position to clamp the phosphate backbones of straight operator DNA when the β -sheet is inserted into the major groove (Figures 2 and 4). In contrast, the other three repressors have to bend DNA around the more protruding β -sheet to place the phosphate backbone in hydrogen bonding distance to N-H groups of the N-termini of their helices $\alpha 2$. It is notable that the distances between phosphates bound by $\alpha 2$ helices is 5 bp in ω_2 (Figure 4) but 6 bp in the other three RHH₂ since DNA has to follow a longer path when bending around the protruding β -sheet.

The N-termini of RHH₂ proteins are associated with different functions

The N-terminus in CopG₂ has no obvious function, in MetJ₂ it is involved in binding the corepressor S-adenosylmethionine whereas in free Arc₂ it is disordered but forms a 3₁₀ helix upon and contributes to DNA-binding. The N-terminal residues in ω_2 do not contribute to DNA-binding *in vitro* and *in vivo* as shown in the present work. However, we have recently shown that protein δ , a homolog to ParA proteins and involved in active plasmid partitioning during cell division, is activated by wt ω_2 but not by $\Delta 19\omega_2$ (A. Cicek, F. Pratto, W. Weihofen, J.C. Alonso and W. Saenger, unpublished data). This suggests that ω_2 is the yet missing ParB protein of *inc18* family plasmids in the known ParA/ParB family of plasmid partitioning systems (29).

Direct and indirect readout of DNA sequence

Cocrystallized $\Delta 19\omega_2$ -bound and free ($\rightarrow\rightarrow$)-DNA show similar phosphate backbone conformation (Figure 2C) with significant deviations from ideal B-DNA (Figure 7), indicating that conformation is predominantly dependent on DNA sequence and not induced by $\Delta 19\omega_2$ binding. This provides a good example for the 'indirect' readout of local DNA conformation by $\Delta 19\omega_2$ that depends on the particular nucleotide sequence (30). The combination with 'direct' readout resulting from interactions of ω_2 repressor amino acids with heptad bases increases protein–DNA-binding specificity and affinity. This view is consistent with studies in which the heptad nucleotide sequence was mutated base pair by base pair (8). Mutations at heptad positions 2, 3 and 5 (5'-AATCACA-3') resulted in at least 4-fold weaker binding to wt ω_2 , although these base pair are not directly contacted by repressor side-chains contrasting direct read out positions 4 and 6 that were much more sensitive against mutations.

Protein Data Bank accession codes

Atomic coordinates and structure factors have been deposited with the Protein Data Bank under accession codes 2bnw, 2bnz and 2cax.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge beamtime and technical support at the Protein Structure Factory beamlines of Free University Berlin at BESSY/Berlin. This work was partially supported by Fonds der Chemischen Industrie to W.S., BMC2003-00150 from Dirección General de Investigación, Ministerio de Educación y Ciencia to J.C.A., and QLK3-CT-2001-00277 from the European Community to J.C.A. and W.S. Funding to pay the Open Access publication charges for this article was provided by Free University Berlin.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- de la Hoz, A.B., Ayora, S., Sitkiewicz, I., Fernandez, S., Pankiewicz, R., Alonso, J.C. and Ceglowski, P. (2000) Plasmid copy-number control and better-than-random segregation genes of pSM19035 share a common regulator. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 728–733.
- Raumann, B.E., Rould, M.A., Pabo, C.O. and Sauer, R.T. (1994) DNA recognition by β -sheets in the Arc repressor-operator crystal structure. *Nature*, **367**, 754–757.
- Gomis-Ruth, F.X., Sola, M., Acebo, P., Parraga, A., Guasch, A., Eritja, R., Gonzalez, A., Espinosa, M., del Solar, G. and Coll, M. (1998) The structure of plasmid-encoded transcriptional repressor CopG unliganded and bound to its operator. *EMBO J.*, **17**, 7404–7415.
- Somers, W.S. and Phillips, S.E. (1992) Crystal structure of the met repressor-operator complex at 2.8 Å resolution reveals DNA recognition by β -strands. *Nature*, **359**, 387–393.
- Brantl, S. (1994) The *copR* gene product of plasmid pIP501 acts as a transcriptional repressor at the essential *repR* promoter. *Mol. Microbiol.*, **14**, 473–483.
- Pujol, C., Chedin, F., Ehrlich, S.D. and Janniere, L. (1998) Inhibition of a naturally occurring rolling-circle replicon in derivatives of the τ -replicating plasmid pIP501. *Mol. Microbiol.*, **29**, 709–718.
- Ceglowski, P., Boitsov, A., Chai, S. and Alonso, J.C. (1993) Analysis of the stabilization system of pSM19035-derived plasmid pBT233 in *Bacillus subtilis*. *Gene*, **136**, 1–12.
- de la Hoz, A.B., Pratto, F., Misselwitz, R., Speck, C., Weihofen, W., Welfle, K., Saenger, W., Welfle, H. and Alonso, J.C. (2004) Recognition of DNA by ω protein from the broad-host range *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035: analysis of binding to operator DNA with one to four heptad repeats. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 3136–3147.
- Glass, C.K. (1994) Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr. Rev.*, **15**, 391–407.
- Misselwitz, R., de la Hoz, A.B., Ayora, S., Welfle, K., Behlke, J., Murayama, K., Saenger, W., Alonso, J.C. and Welfle, H. (2001) Stability and DNA-binding properties of the ω regulator protein from the broad-host range *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035. *FEBS Lett.*, **505**, 436–440.
- Murayama, K., Orth, P., de la Hoz, A.B., Alonso, J.C. and Saenger, W. (2001) Crystal structure of ω transcriptional repressor encoded by *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035 at 1.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **314**, 789–796.
- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In Carter, C.W. Jr and Sweet, R.M. (eds), *Macromolecular Crystallography Part A*. Academic Press, pp. 307–326.
- Storoni, L.C., McCoy, A.J. and Read, R.J. (2004) Likelihood-enhanced fast rotation functions. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **60**, 432–438.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A. and Dodson, E.J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **53**, 240–255.
- Vagin, A. and Teplyakov, A. (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Cryst.*, **30**, 1022–1025.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. and Thornton, J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283–291.
- Kraulis, P.J. (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **24**, 946–950.
- Merritt, E.A. and Bacon, D.J. (1997) Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Meth. Enzymol.*, **277**, 505–524.
- Lavery, R. and Sklenar, H. (1988) The definition of generalized helicoidal parameters and of axis curvature for irregular nucleic acids. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **6**, 63–91.
- Schultz, S.C., Shields, G.C. and Steitz, T.A. (1991) Crystal structure of a CAP–DNA complex: the DNA is bent by 90 degrees. *Science*, **253**, 1001–1007.
- Spink, N., Nunn, C.M., Vojtechovsky, J., Berman, H.M. and Neidle, S. (1995) Crystal structure of a DNA decamer showing a novel pseudo four-way helix–helix junction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 10767–10771.
- Nunn, C.M., Garman, E. and Neidle, S. (1997) Crystal structure of the DNA decamer d(CGCAATTGCG) complexed with the minor groove binding drug netropsin. *Biochemistry*, **36**, 4792–4799.
- Aggarwal, A.K., Rodgers, D.W., Drott, M., Ptashne, M. and Harrison, S.C. (1988) Recognition of a DNA operator by the repressor of phage 434: a view at high resolution. *Science*, **242**, 899–907.
- Saenger, W. (1984) *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag, NY.
- Shatzky-Schwartz, M., Arbuckle, N.D., Eisenstein, M., Rabinovich, D., Bareket-Samish, A., Haran, T.E., Luisi, B.F. and Shakked, Z. (1997) X-ray and solution studies of DNA oligomers and implications for the structural basis of A-tract-dependent curvature. *J. Mol. Biol.*, **267**, 595–623.
- Han, G.W., Kopka, M.L., Cascio, D., Grzeskowiak, K. and Dickerson, R.E. (1997) Structure of a DNA analog of the primer for HIV-1 RT second strand synthesis. *J. Mol. Biol.*, **269**, 811–826.
- Chen, S., Gunasekera, A., Zhang, X., Kunkel, T.A., Ebright, R.H. and Berman, H.M. (2001) Indirect readout of DNA sequence at the primary-kink site in the CAP–DNA complex: alteration of DNA binding specificity through alteration of DNA kinking. *J. Mol. Biol.*, **314**, 75–82.
- El Hassan, M.A. and Calladine, C.R. (1998) Two distinct modes of protein-induced bending in DNA. *J. Mol. Biol.*, **282**, 331–343.
- Pogliano, J. (2002) Dynamic cellular location of bacterial plasmids. *Curr. Opin. Microbiol.*, **5**, 586–590.
- Otwinowski, Z., Schevitz, R.W., Zhang, R.G., Lawson, C.L., Joachimiak, A., Marmorstein, R.Q., Luisi, B.F. and Sigler, P.B. (1988) Crystal structure of trp repressor/operator complex at atomic resolution. *Nature*, **335**, 321–329.

Binding of regulatory protein omega from *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035 to direct and inverted 7-base pair repeats of operator DNA

Lubomír Dostál,¹ Florencia Pratto,² Juan C. Alonso² and Heinz Welfle^{1*}

¹ Max-Delbrueck-Centrum fuer Molekulare Medizin Berlin-Buch, Robert-Roessle-Str. 10, D-13092 Berlin, Germany

² Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, C.S.I.C., E-28049, Madrid, Spain

Received 10 March 2006; Accepted 17 June 2006

pSM19035-encoded dimeric regulator omega (ω_2) belongs to the MetJ/Arc family of ribbon–helix–helix DNA binding proteins. ω_2 binds to a set of unspaced 7-base pair repeat units with sequence 5'-A/TATCAC^A/T-3'. Protein ω_2 and its variant $\omega_2\Delta N18$, lacking the first 18 N-terminal amino acids, bind poorly to one heptad DNA, but the affinity to DNA markedly increases with two and more heptads organized in direct or inverted orientation. Raman difference spectra indicate that ω_2 and $\omega_2\Delta N18$ bind to operator DNA in the major groove and contact thymine, adenine and guanine residues. The mode of ω_2 or $\omega_2\Delta N18$ interaction with operator DNA is not affected by the orientation and number of heptads. The Raman data of ω_2T29A , an ω_2 variant with Ala instead of Thr at position 29 of the β -sheet, show a sequence-independent binding mode to DNA, which differs from the binding mode of wt ω_2 protein to its cognate site. The Raman data strongly support the notion that the 18 N-terminal amino acids are not required for ω_2 activity, whereas Thr29 plays an essential role for operator DNA binding. The data suggest the formation of a hydrogen bond between Thr29 of wild-type ω_2 to one of the bases in the central 5'-TCA-3'/5'-TGA-3' stretch of the 7-bp binding site. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: transcriptional repressor; ω -protein; ribbon-helix-helix proteins; protein-DNA interaction; Raman difference spectra

INTRODUCTION

In bacteria there are approximately 300 transcription factors (271 in *Escherichia coli*), but only 11 different DNA binding domains.¹ The majority of transcriptional repressors have at least one binding site downstream of the transcription start site, whereas the majority of activators have only upstream binding sites.² Furthermore, transcription factors bind preferentially to palindromic operators, whereas recognition of arrays of short direct DNA repeats is common in eukaryotes but rare in bacteria.^{3–6} The ribbon–helix–helix (RHH)^a or $(\beta\alpha\alpha)_2$ proteins, using antiparallel β -sheets for DNA binding, are a family of DNA-binding proteins that interact with inverted or directed repeats.^{7–14} Structures of symmetric or pseudosymmetric RHH dimers bound to their operators have been reported for MetJ, Arc and CopG repressors.^{7,8,10} Among the characteristics associated with the DNA-binding

domain of $(\beta\alpha\alpha)_2$ proteins are two-stranded antiparallel β -sheets that make sequence-specific contacts with the major groove of DNA, and several residues of the second α -helix interact with phosphates of the DNA backbone. In addition to their ordered $(\beta\alpha\alpha)_2$ domain, MetJ, Arc, ParG and NikR proteins contain mobile N-terminal ends that make or might make further DNA contacts with their cognate sites.^{7,8,12,13} Most RHH proteins bind as tetramers, or higher order oligomers, to operator sequences containing two or more half-sites that are usually arranged as inverted repeats.^{7,8,10} The MetJ interacts symmetrically to 8 base pair (bp) tandem repeats with internal symmetry which are present 2–5 times, whereas the Arc and CopG proteins bind asymmetrically to two 9-bp and 10-bp sites in a palindromic arrangement, respectively.^{7,8,10,15} When bound to these operators, adjacent RHH dimers interact, leading to strong and cooperative association.

The *Streptococcus pyogenes* pSM19035-encoded dimeric ω -transcriptional repressor (ω_2) belongs to the MetJ/Arc family of RHH DNA-binding proteins and binds only to upstream promoter regions of genes involved in copy

*Correspondence to: Heinz Welfle, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Postfach 740238, D-13092 Berlin, Germany. E-mail: welfle@mdc-berlin.de

number control (*PcopS*), partition (*Pδ/parS*) and partition and post-segregational killing (*Pω*).^{3,16,17} Up to 12 unspaced copies of a 7-bp repeat unit (top strand 5'-^A/TATCAC^A/T-3', symbolized by → with the arrowhead at the 3' end, and top strand 5'-^T/ATGTGA^T/A-3', symbolized by ← with the arrowhead at the 5' end) are located in the promoter region of *copS* (→→→→→→→→→→→→), *δ*(→→→→→→→→→→) and *ω*(→→→→→→→→→→) genes, and these repeat units represent the *bona fide* ω_2 -DNA binding sites.³ The multitude of differently arranged DNA-binding sites suggests a possible biological importance. Stoichiometry studies have revealed that one ω_2 interacts with one heptad or subsite with low affinity (apparent binding constant, $K_{d,app} > 500$ nM).¹⁸ Unlike MetJ, Arc and ParG whose half-sites are separated by 1–16 bp of intervening DNA,^{7,8,10,18} binding of ω_2 to two heptads separated by one or more bp is ~20-fold lower when compared with unspaced half-sites.¹⁸ The ω_2 binding affinity to operators comprising two consecutive unspaced heptads arranged as direct (→→) or inverted (→←) repeats is high ($K_{d,app} \sim 20$ nM).¹⁸ The affinity for diverging repeats (←→) is ~6-fold weaker when compared with direct (→→) or (→←) inverted head-to-head repeats.¹⁸ The $K_{d,app}$ of ω_2 for a full site *PcopS*, *Pδ/parS* or *Pω* is ~4 nM.^{3,18} We have determined by using hydroxyl radical footprinting the region that is recognized by ω_2 . The footprints are consistent with a region of protein–DNA interaction on 5'-ATC-3' of the top strand and 5'-GTG-3' of the bottom strand independent of the diheptad orientation.¹⁸ The stoichiometry of binding revealed one ω_2 protein per heptad.¹⁸

Diheptads with head-to-head (→←) and tail-to-tail (←→) orientation have 2-fold axes of symmetry at the junction between the heptads and probably bind two ω_2 in a symmetry-related manner. Diheptads in head-to-tail orientation (→→) do not have an axis of symmetry, therefore we wondered whether their complex with two ω_2 dimers might have significantly different properties compared with the symmetry-related binding sites. Symmetry arguments suggest that ω_2 protein will be aligned with the unique 2-fold axis of symmetry of →← and ←→ heptads forming the interface between two ω_2 by subunits A and B (Fig. 1(B)).¹¹ The alignment is different with the →→ diheptad, where subunits A' and B form the interface (Fig. 1(A)). The symmetric structure of ω_2 possibly eliminates differences in the front and back views and provides the opportunity for the formation of largely similar interfaces.

Unordered *N*-terminal amino acid stretches of different lengths were identified by NMR spectroscopy for the related RHH proteins Arc, ParG and HP0222 in solution,^{12,14,19} and could not be localized in crystal structures.^{7,8} The *N*-terminus of the 71-residues-long ω subunit is probably unordered in wt ω_2 , as was suggested by secondary structure prediction and analysis.²⁰ During crystallization, the *N*-terminal 22 residues of ω were cleaved ($\omega_2\Delta N22$).¹¹ The X-ray structure of $\omega_2\Delta N22$ dimer features a two-stranded β -sheet with antiparallel pairing of residues 28–32 of each subunit followed by

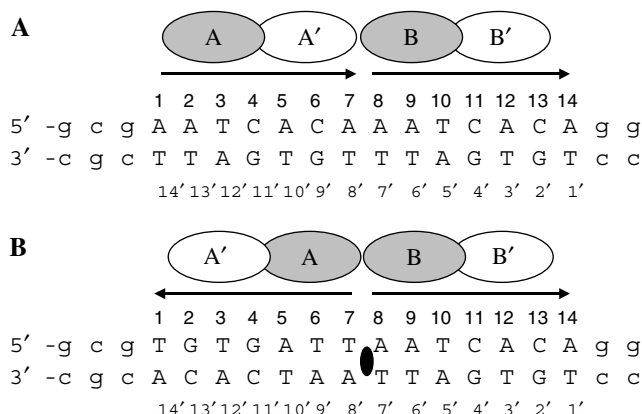


Figure 1. Schematic representation of two ω_2 -operator DNA complexes. Bases of the 7-bp repeats are numbered by 1–14 (top strands) and 1'–14' (bottom strands). At positions 1, 7, 8 and 14 both an A or a T could be present. For simplicity, sequences 5'-AATCACA-3' and 5'-TGTGATT-3' were chosen. Additional bases at the 5'- and 3'- ends are given in lower case letters. Arrows indicate the orientation of the heptads. ω_2 subunits are symbolized by grey and white ellipses and labelled by A/A' and B/B'. (A) Complex with fragment III. The interface is formed by subunits A/B (heptads in head-to-tail orientation). (B) Complex with fragment II. The interface is formed by subunits A/B (heptads in tail-to-tail orientation). A black ellipse symbolizes the 2-fold symmetry axis of DNA fragment II.

α -helices $\alpha 1$ (residues 34–46) and $\alpha 2$ (residues 51–66).¹¹ Previously it was shown that *Bacillus subtilis* plasmid-borne wt ω gene or modified ω genes that encode products lacking the first 8 ($\omega_2\Delta N8$), 18 ($\omega_2\Delta N18$) or 19 ($\omega_2\Delta N19$) *N*-terminal residues reduced by 15-fold *Pδ* utilization *in vivo*; but a plasmid-borne ω gene, the product of it that lacks the first 25 *N*-terminal residues ($\omega_2\Delta N25$), was unable to repress *Pδ* utilization.²¹ The stability of $\omega_2\Delta N18$ is similar to that of wt ω_2 , and its binding to operator DNA is not impaired.²¹ However, the direct influence of the *N*-terminal amino acids on DNA binding remains to be addressed.

In the modeled ω_2 -DNA complex, the antiparallel β -ribbon of ω_2 contains Arg31 and Arg31' (corresponding to Arg13 and Arg13' in Arc), whose side chains are directed toward the DNA major groove and would be able to make asymmetric contacts with guanines.¹¹ The side chain of Thr29 and Thr29' are exposed at the face of the β -sheet of ω_2 protein.¹¹ To gain insight of the role of the *N*-terminal amino acids, the importance of Thr29 and the properties of the operator DNA-binding sites and their functional relevance, Raman spectroscopic studies were performed on two ω variants ($\omega_2\Delta N18$, and ω_2T29A in which Ala replaces the solvent exposed Thr29²¹), and their complexes with DNA fragments containing one heptad (→), diheptads in head-to-head (→←), tail-to-tail (←→) and head-to-tail (→→) orientation, and four heptad repeat units in two different orientations (→₂←→ and →₄) (Table 1). The experiments

Table 1. Double stranded DNA fragments used in the Raman studies

dsDNA	Sequence	Heptad number and orientation
12-bp Fragment I	5'-gcgAATCACAgg 3'-cgc T TAGTGTcc	Monoheptad, →
19-bp Fragment II	5'-gcgTGTGATTAATCACAgg 3'-cgcA CACTAATTAGTGTcc	Diheptad, tail-to-tail, ←→
19-bp Fragment III	5'-gcgAATCACAAAATCACAgg 3'-cgcT TAGTGTTTAGTGTcc	Diheptad, head-to-tail, →→
19-bp Fragment IV	5'-gcgAA TCACATGTGAT Tgg 3'-cgc T TAGTGTACACTAA cc	Diheptad, head-to-head, →←
33-bp Fragment V	5'-gcgAATCACAAAATCACAAAATCACAAAATCACAgg 3'-cgcTTAGTG T T TAGTGTTTAGTGTTTAGTGTcc	Tetraheptad, →→→→
33-bp Fragment VI	5'-gcgAATCACAAAATCATGTGATTAATCACAgg 3'-cgcTTAGTGTTTAGTGTACACTAATTAGTG Tcc	Tetraheptad
19-bp Fragment VII	5'-gcgAGTAC TGCTATAATgg 3'-cgcT CATGACGATATTA cc	No
19-bp Fragment VIII	5'-gcgATATACGCATATACgg 3'-cgc TATATGCG TATATGcc	No

Fragments II–VI were designed as operator DNA models with heptads in direct (→) and inverted (←) orientation as indicated by arrows. Fragments VII and VIII have the same base pair content but an arbitrarily chosen sequence; they were expected to bind ω_2 nonspecifically and served as nonoperator DNA models. The flanking base pairs gcg/cgc and gg/cc given in lower case letters were intended to prevent fraying.

presented here established that the unordered 18 *N*-terminal amino acids are not required for ω_2 interaction with its cognate bases, whereas amino acid Thr29 is essential for specific operator DNA binding.

EXPERIMENTAL

Bacterial strains and plasmids

Plasmids pT712 ω , pT712 ω Δ N18 and pT712 ω T29A have been previously described.¹⁸ *E. coli* strain BL21(DE3) bearing plasmid-borne wt ω gene (pT712 ω) or variant ω Δ N18 and ω T29A genes (pT712 ω Δ N18, pT712 ω T29A) were used for protein expression and purification.²¹ Protein ω_2 T29A has the same sequence as wt ω_2 except the single amino acid exchange Thr29A.²¹ The sequence of variant protein ω_2 Δ N18 starts with Met1 as that of ω_2 , but has at position 2 amino acid 19 of the ω_2 sequence, and therefore the variant protein misses ω residues 2–18 at the *N*-terminal end.²¹

Chemicals

Ultrapure urea was obtained from ICN Biomedicals, Eschwege, Germany, and suberic acid bis (*N*-hydroxysuccinimide ester) (DSS) was from Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany. All other reagents were purchased from Merck, Darmstadt, Germany. Phosphocellulose was from Whatman, Maidstone, UK. Superose 12, SP-sepharose, and heparin-sepharose were from Amersham Biosciences, Freiburg, Germany.

Protein and DNA purification

The wt ω_2 , ω_2 T29A and ω_2 Δ N18 proteins were over-expressed and purified towards homogeneity from *E. coli* BL21(DE3) pLysS cells carrying pT712 ω , pT712 ω T29A or pT712 ω Δ N18 genes after induction with IPTG and addition of rifampicin according to essentially the same protocol as described²⁰ recently for the preparation of wt ω_2 . The protein concentrations (g/l) were determined from the absorbance at 276 nm using absorption coefficients of $A_{1\%,1\text{ cm}} = 3.64$, 3.63 and 4.77 for ω_2 T29A, wt ω_2 and ω_2 Δ N18 proteins, respectively, calculated from the amino acid composition (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>). Molar concentrations were given in dimer equivalents.

The DNA samples were prepared and purified as described elsewhere.^{18,22} The oligonucleotides were purchased from the Department of Functional Genomics and Proteomics of the Masaryk University Brno, Czech Republic. The DNA fragments used in this study are summarized in Table 1.

Concentrations of the DNA duplexes were determined spectrophotometrically using an extinction coefficient $\varepsilon_{260\text{ nm}} = 12978\text{ M} \times (\text{bp})^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ calculated from the base composition.²³

Preparation of DNA and ω_2 –DNA complexes for Raman measurements

Equimolar amounts of the oligonucleotides were mixed, annealed at 95 °C and purified by gel filtration on a Superdex 200 column in 50 mM Tris–HCl buffer pH 7.5, 50 mM NaCl.

The protein–DNA complexes were prepared by mixing appropriate amounts of the components in 50 mM Tris–HCl pH 7.5, 50 mM NaCl and 10 mM MgCl₂ to produce a 1 : 1 molar ratio of protein (in ω_2 dimer equivalents) to heptad. Mixtures of proteins with fragments VII and VIII were prepared in the same molar ratio as for diheptad containing fragments II–IV. The samples were concentrated in a Millipore Ultrafree centrifugal filter device. Complex formation was controlled by 12.5% (w/v) nondenaturing PAGE in TEB buffer.

Raman measurements

Raman spectra were excited with the 488 nm line of a Coherent Innova 90 argon laser using approximately 100 mW of excitation energy at sample space. The spectra were collected at 22 °C on a T64000 (Jobin Yvon, France) spectrometer equipped with a liquid nitrogen–cooled charge-coupled device (CCD) detector. Fifteen spectra of 120 s each were accumulated in the region 600–1750 cm⁻¹ and averaged. In order to exclude all possible drifts of the wavenumber scale during the data measurement, a calibration spectrum was collected after each 120 s sample spectra accumulation step. The calibration procedure is described in detail in the subsequent.²⁴

Raman data were analyzed with the software package LabSpec (Jobin Yvon) and GRAMS (Thermo Galactic). For calculation of the difference spectra, the single-component spectra were normalized, to minimize intensity differences, to the complex spectrum in the Raman band near 1092 cm⁻¹ that is assigned to P–O stretching vibration of the phosphodiester group (PO₂⁻) and is invariant to repressor–operator complex formation,²⁵ and to the Raman band near 1447 cm⁻¹ that is assigned to CH₂ scissoring mode of C2'H₂ groups. Normalized, but otherwise uncorrected, DNA and protein spectra were subtracted from the spectrum of the complex, and finally the buffer contributions and fluorescence background that was approximated by a polynomial curve were removed.

Difference bands were considered as significant when the following criteria were fulfilled: (1) their intensity was at least two times higher than the signal-to-noise ratio; (2) the difference bands reflected intensity changes of at least 5% of their parent bands; and (3) they were higher than differences in reference DNA–protein complex measurement. For smoothing of difference spectra, the 11-point Savitsky–Golay algorithm was used.

RESULTS

Raman signature of DNA fragments

The Raman spectrum of fragment IV containing two heptads in the head-to-head orientation ($\rightarrow\leftarrow$) is shown in Fig. 2. Traces 1 and 2 show the spectra of fragment IV in D₂O and H₂O buffer, respectively. Wavenumber positions of the major peaks are labeled. The peak positions are in general accordance with those of B-DNA and C2'-*endo/anti* nucleoside conformers given previously in the

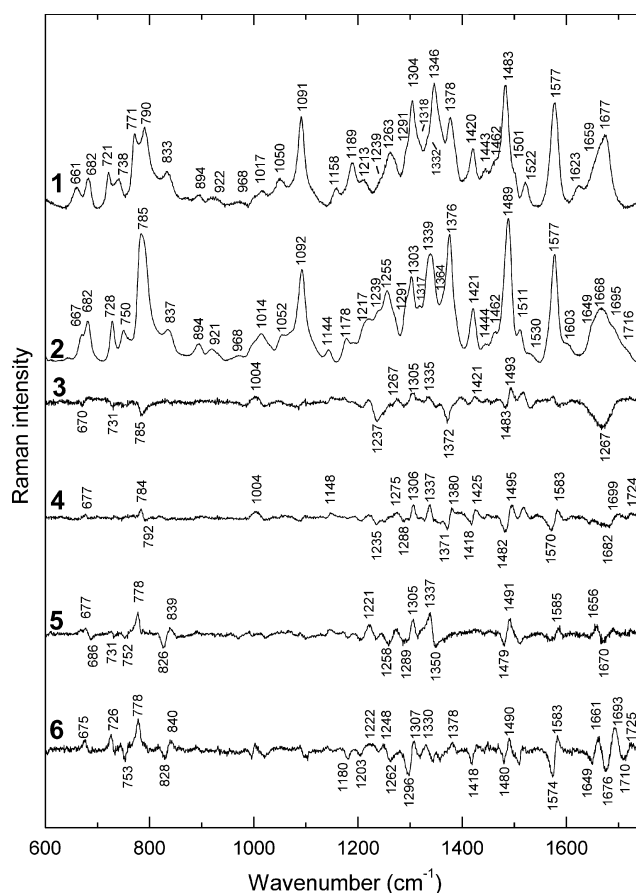


Figure 2. Raman spectra of 19-bp DNA fragments. Spectra of fragment IV in D₂O (trace 1) and H₂O (trace 2) solution. Three times enlarged Raman difference spectra were calculated by subtraction of the H₂O spectra of fragment III (trace 3), II (trace 4), VII (trace 5) and VIII (trace 6) from the H₂O spectrum of fragment IV. Sample buffer is 50 mM NaCl, 50 mM Tris–HCl pH 7.5 for spectra shown in traces 2–6 or pH 7.5 for trace 1; data were collected at 22 °C in the spectral region 600–1750 cm⁻¹. Concentrations of fragment IV were 23 mg ml⁻¹ (H₂O) and 14 mg ml⁻¹ (D₂O). Spectra were normalized with respect to the integrated intensity of the phosphate band near 1092 cm⁻¹ and/or the adenine–guanine band^(29,36) near 1580 cm⁻¹. Peak positions of prominent Raman bands are labeled; the given wavenumbers are accurate to within ± 0.5 cm⁻¹.

literature (Refs 26–31 and references therein). Furthermore, 3 \times enlarged difference spectra are shown in Fig. 2. The difference spectra were obtained by subtraction of the fragment spectra II, III, VII and VIII from the DNA fragment IV spectrum. The data indicate mostly similar C2'-*endo/anti* deoxynucleoside conformers with gauche⁻ (g⁻) conformations for the phosphodiester torsion angles α and ζ .^{26,27} All the studied DNA fragments differ to some extent in stacking properties and deoxynucleoside conformations. The major groove dimensions of heptad containing fragments

II–IV are very similar and broader compared with those of random sequence fragments VII and VIII, as indicated by the positions of the B-DNA conformation marker.^{26,32–34}

Raman signatures of wt ω_2 , ω_2 T29A and $\omega_2\Delta$ N18

Wt ω_2 , $\omega_2\Delta$ N18 and ω_2 T29A are highly soluble proteins amenable for Raman analysis. The Raman spectra of the ω_2 protein are shown in Fig. 3 in the fully protonated (nonexchanged) form measured in H₂O buffer (trace 2), and for partially deuterated ω_2 in D₂O (trace 1). Trace 3 shows the computed Raman difference spectrum (trace 1 minus trace 2) and represents the effects of native exchange, i.e. that of exchangeable hydrogen atoms in the folded

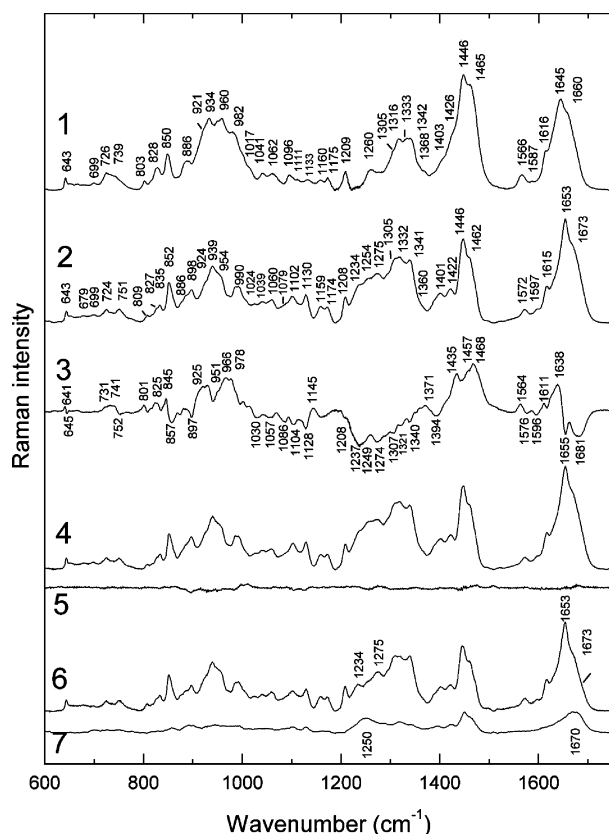


Figure 3. Raman spectra of protein ω_2 . Trace 1, natively H–D exchanged ω_2 ; trace 2, wild-type ω_2 ; trace 3, difference spectrum (trace 2 minus trace 1); trace 4, spectrum of ω_2 T29A; trace 5, difference spectrum wt ω_2 minus ω_2 T29A (trace 2 minus trace 4); trace 6, spectrum of $\omega_2\Delta$ N18; trace 7, difference spectrum wt ω_2 minus $\omega_2\Delta$ N18 (trace 2 minus trace 6). Experimental conditions were as given in the legend of Fig. 2. Protein concentrations are 63 mg ml^{−1} ω_2 in H₂O buffer, 42 mg ml^{−1} ω_2 in D₂O buffer and ~50 mg ml^{−1} for ω_2 T29A and $\omega_2\Delta$ N18. Peaks appeared in the difference spectrum 3 when natively unprotected protons were exchanged against deuterons and the Raman bands shifted. Peak positions of prominent Raman bands in traces 1–3 and secondary structure elements of trace 5 are labeled by the respective wavenumbers, which are accurate to within ± 0.5 cm^{−1}.

state of ω_2 . Assignment of all the Raman bands of trace 2 and corresponding wavenumbers caused by H \rightarrow D exchange (trace 1) are based upon literature data.^{32,35,36} The contribution to the trough at 1237 and the peak at 978 cm^{−1} is caused by β -strands; the trough/peak feature at 1274/966 cm^{−1} indicates α -helix; and irregular structures are responsible for the feature at 1237 and 1249/925 cm^{−1}. A weak band at 1260 cm^{−1} is possibly caused by an aromatic side chain or, alternatively, indicates incomplete deuteration of the α -helices. The features of the amide I and amide I' bands with troughs and peak, respectively, near 1681 and 1655 or 1638 cm^{−1} provide additional Raman signatures for native (incomplete) deuterium exchange of secondary structure elements.

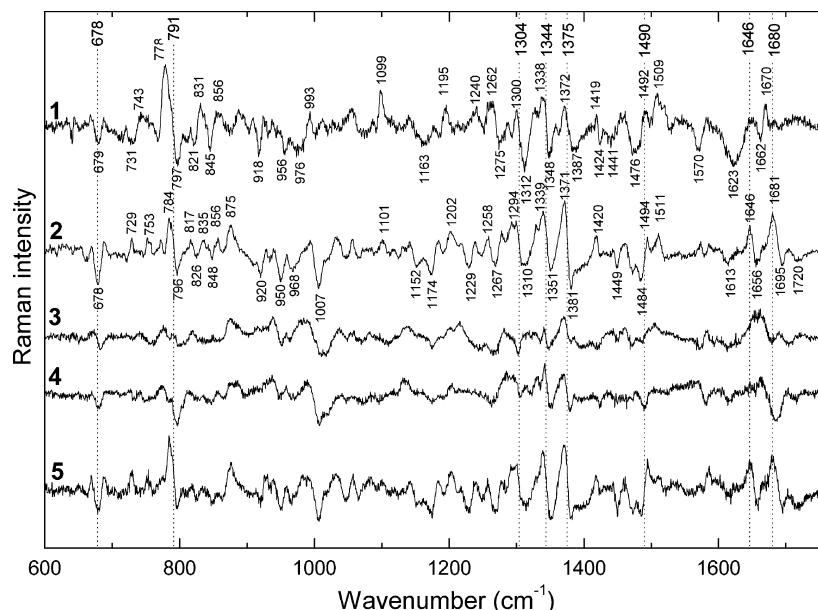
A very weak amide II band at 1550–1560 cm^{−1}, not visible in Fig. 3, trace 2, represents N–H in-plane bending and C–N stretching of the *trans* peptide groups. Deuteration of those groups causes an intense amide II' band at 1465 cm^{−1} (trace 1) and results in the most prominent feature of the difference spectrum with a peak at 1468 cm^{−1} (trace 3). This band can be assigned³² to the non- α -helical (unprotected) sites of ω_2 .

The Raman spectrum of ω_2 T29A is shown in Fig. 3 (trace 4); subtraction of ω_2 T29A spectrum (trace 4) from wt ω_2 spectrum (trace 2) results in the difference spectrum shown by trace 5, which illustrates largely similar structures of the wild-type and variant protein. The major differences are located between 870 and 1150 cm^{−1} and can be assigned to the C–C stretching vibrations of amino acid side chains.

Figure 3 shows the Raman spectrum of $\omega_2\Delta$ N18 (trace 6), normalized with respect to the tyrosine bands of wt ω_2 , and a difference spectrum (trace 7) was computed by subtraction of the $\omega_2\Delta$ N18 spectrum (trace 6) from the wt ω_2 spectrum (trace 2), which exhibits large differences between the two proteins. The most prominent difference features concern the shape of the amide I band at 1670 cm^{−1} and the amide III band near 1250 cm^{−1}. According to those features, the content of unordered structures in $\omega_2\Delta$ N18 is much lower compared with that in wt ω_2 , suggesting that the 18 N-terminal amino acids of wt ω_2 are mostly unordered.

Raman analysis of wt ω_2 –DNA complexes

Raman spectra of ω_2 –fragment IV ($\rightarrow \leftarrow$) and its components were measured in H₂O and D₂O. Difference spectra (spectra of complex minus component spectra) are shown in Fig. 4 by traces 1 (D₂O) and 2 (H₂O). When appropriate, in the following text peak positions of deuterated samples will be given in brackets. The two difference spectra were amplified and smoothed for clarity and used for further analysis. The features of the difference spectra provide information about conformational changes, structural rearrangements and interactions between the components of the complex.



1720 cm^{-1} difference trough observed in the difference spectra suggests a hydrogen bond between guanine O6 and protein side chains. This observation is consistent with the interactions of guanine to protein side chains from the β -sheet that are able to produce two hydrogen bonds. Arg31 was proposed to be a candidate for such a contact.¹¹

ω_2 binding alters the adenine Raman marker bands at 1339 (1346) and 1303 (1304) cm^{-1} . The peak/trough feature at 1339/1350 cm^{-1} of the adenine band near 1344 cm^{-1} was assigned to interactions of adenine N6H₂ and/or N7 in the Arc-operator DNA complex.⁴⁰ Similarly, the peak/trough feature at 1339/1351 cm^{-1} could reflect the hydrogen-bond formation of adenine N6H₂ and/or N7 groups. Another adenine derivative feature (peak at 1300 (1294) cm^{-1} and trough at 1312 (1310) cm^{-1}) points to the existence of a direct contact of an adenine residue with ω_2 .

The Raman peak at 1376 (1378) cm^{-1} is assigned to the thymine exocyclic C5H₃ group. The intensity increase of this band is correlated with increased hydrophobicity in the surrounding of thymine C5H₃ groups, as observed in repressor-DNA complexes, in which the thymine C5H₃ groups are shielded by hydrophobic side chains of the bound repressor.^{30,37} The difference spectrum of ω_2 -fragment IV shows a peak/trough feature at 1371/1381 (1372/1387) cm^{-1} . For the hSRY-HMG-DNA system, similar features were observed, but so far not definitively interpreted, although protein contacts are considered as possibly responsible.²⁸ In addition, the thymine C4O vibrations at ~ 1650 and ~ 1673 (1667) cm^{-1} indicate peak/trough features at 1646/1656 cm^{-1} in H₂O and 1670/1662 cm^{-1} in D₂O solution, which is consistent with a hydrogen-bond formation of ω_2 with C4O of thymine.^{41,42}

These Raman difference features show that the possible candidates for direct contacts with wt ω_2 are guanine, adenine and thymine residues. An interaction marker for cytosine contacts has not been revealed so far but is expected in the region of most prominent cytosine Raman bands between 1200 and 1300 cm^{-1} .

Secondary structure of ω_2

The difference spectra of wt ω_2 -DNA complex in H₂O and D₂O buffers are very similar in the 900–1000 cm^{-1} region, in which amide III bands are located after H-D exchange (Fig. 3, traces 1 and 2). Complex formation seems to induce only minute changes in regions of the protein spectrum in which secondary structure is indicated.

Binding of ω_2 T29A or $\omega_2\Delta$ N18 to operator DNA

Several features present in the wt ω_2 -fragment IV difference spectrum (Fig. 4, trace 2) are missing or present in reduced intensity in ω_2 T29A-fragment II difference spectrum (Fig. 4, trace 4), as the trough at 678 cm^{-1} (dG), peak/trough at 784/796 cm^{-1} (DNA backbone), trough at 920 cm^{-1} (DNA backbone), peak/trough at 1294/1310 cm^{-1} (dA), peak/trough at 1339/1351 cm^{-1} (dA), peak/trough

at 1371/1381 cm^{-1} (dT), peak at 1420 cm^{-1} (DNA backbone), trough/peak at 1484/1494 cm^{-1} (dG, dA) and peak at 1681 cm^{-1} . These changes are assigned to specific interactions with DNA bases and specific DNA conformation modifications. They illustrate a very different binding mode of the mutant protein to operator DNA compared with wt ω_2 -operator DNA complex and point to the direct interaction of Thr29 with DNA residues. The difference spectrum of ω_2 T29A-fragment II complex is similar to that of wt ω_2 complex with arbitrary DNA (fragment VIII) and reveals unspecific interactions. Binding studies indicate a <500 -fold reduced specific affinity of ω_2 T29A to three heptads DNA ($\rightarrow\rightarrow\leftarrow$) when compared with wt ω_2 ($K_{d,\text{app}}$ 10 nM).²² This is consistent with the observation that a unique copy of a plasmid-borne ω T29A gene in the *B. subtilis* chromosome is unable to repress *P δ* utilization.²¹

On the contrary, $\omega_2\Delta$ N18-fragment IV (Fig. 4, trace 5) and wt ω_2 -fragment IV (Fig. 4, trace 2) have very similar difference spectra. Obviously, the 18 N-terminal amino acids of wt ω_2 do not significantly contribute to spectral changes connected with complex formation. This is consistent with the observation that plasmid-borne ω , $\omega\Delta$ N8, $\omega\Delta$ N18 or $\omega\Delta$ N19 genes repress *P δ* utilization to the same extent.^{3,21}

Comparison of complexes with DNA fragments containing mono-, di- and tetraheptads

Figure 5 shows the Raman difference spectra of wt ω_2 complexes with heptad containing fragments I (trace 1, \rightarrow), III (trace 2, $\rightarrow\rightarrow$), IV (trace 3, $\rightarrow\leftarrow$), II (trace 4, $\leftarrow\rightarrow$), V (trace 5, $\rightarrow\rightarrow\rightarrow\rightarrow$) and VI (trace 6, $\rightarrow\rightarrow\leftarrow\rightarrow$). The dashed lines labeled by wavenumbers indicate the most prominent Raman difference features. The Raman difference peaks and troughs are basically similar to those of wt ω_2 -fragment IV (Fig. 5, trace 3, Fig. 4, trace 2). They originate from bands of the deoxyribosyl-phosphate backbone, purine and pyrimidine base residues, and provide strong evidence in favor of similar modes of ω_2 binding to DNA fragments II to IV (diheptads) and V and VI (tetraheptads). Consistently, binding of ω_2 perturbs furanose vibrations, overlapped by protein vibrations of CH₂ scissoring and deformation near 921, 1444, and 1420 cm^{-1} (Fig. 4, trace 2). The features at 921 and 1420 cm^{-1} are weaker in the spectrum of ω_2 -fragment I. Assignment of this features is ambiguous, and they might indicate bending and/or ω_2 – ω_2 interaction.

Minor variations in the basically very similar difference spectra of the ω_2 -DNA complexes (Fig. 5) occur at three most prominent Raman difference bands near 791 cm^{-1} (B-DNA backbone), 1344 cm^{-1} (dA, CH₂ twist/wag), and 1375 cm^{-1} (dT). The Raman difference feature near 791 cm^{-1} may be caused by several factors namely, variations in the torsion angles α and ζ in the ω_2 -DNA complexes,^{29,40,42} and/or by a different number of O–P–O groups involved in the interaction. The difference intensity near 1344 cm^{-1} is possibly related to differences in the orientation of the heptads. Heptad orientations might slightly affect

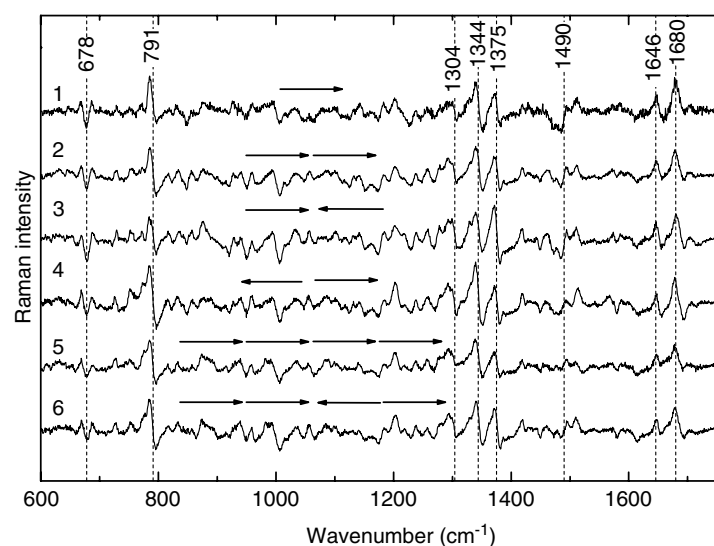


Figure 5. Raman difference spectra of wild-type ω_2 bound to operator DNA fragments containing different number and varying orientation of heptads. Arrows symbolize the heptad orientation in the respective DNA fragments. Trace 1, ω_2 -fragment I; trace 2, ω_2 -fragment III; trace 3, ω_2 -fragment IV; trace 4, ω_2 -fragment II; trace 5, ω_2 -fragment V; trace 6, ω_2 -fragment VI. Concentrations of ω_2 protein in the complexes are between 63 mg ml⁻¹ and 85 mg ml⁻¹.

conformations of the base residues that are in close contact with protein side chains. The differences observed at 1375 cm⁻¹ might reflect variation in stacking interactions (Figs 4 and 5).

As revealed in Fig. 5, the Raman difference spectra of ω_2 complexes with tetraheptads [fragments V (trace 5, →→→→) and VI (trace 6, →→←→)] are very similar to those with diheptads (trace 2, →→; trace 4, ←→; or trace 3, →←). The data do not support pronounced differences caused by the number and orientation of heptads.

Binding of ω_2 to DNA with nonspecific sequence

Figure 4 shows in trace 3 the difference spectrum of the complex wt ω_2 -fragment VIII. The 19-bp fragment VIII does not contain specific 7-bp binding sites for ω_2 . The B-form conformation markers at 832 and 791 cm⁻¹ do not indicate difference features. The DNA backbone of fragment VIII does not change its conformation upon (nonspecific) interactions with ω_2 . The difference spectrum reflects only small perturbations in the nucleoside conformation markers near 682 cm⁻¹ (dG), 774/758 cm⁻¹ (dC) and 1265 cm⁻¹ (dC).

Increased hydrophobicity in the surrounding of thymine C5H₃ groups increases the intensity of the band near 1378 cm⁻¹, as observed in the Raman spectrum of λ repressor–operator DNA complex in which the thymine C5H₃ groups are shielded by hydrophobic side chains of the repressor.⁴³ Similarly, the difference spectrum of the ω_2 -fragment VIII mixture indicates shielding of thymine C5H₃ groups from water environment (peak at 1370 cm⁻¹) (Fig. 4, trace 3).

The peak/trough feature at 1460/1471 cm⁻¹ as well as troughs at 1419 and 1398 cm⁻¹ assigned to protein CH₂

vibrations point to contacts of amino acid side chains and DNA. Such contacts are also reflected in changes of C–C stretching vibrations, the difference spectrum exhibiting a trough at 1174 cm⁻¹ and peaks at 1137, 984 and 939 cm⁻¹ (Fig. 4, trace 3).

DISCUSSION

According to the heptad repeat organization of operator DNA, for the wt ω_2 protein the binding centers of two dimers are 7 bp apart and the half-sites are nonspaced.¹⁸ Raman difference spectra (Figs 3 and 4) exhibit the interaction with adenine, guanine and thymine in the major groove showing that the central 5'-TCA-3' (or its complementary 3'-AGT-5') motif of the heptads might be the main target site for ω_2 or $\omega_2\Delta N18$ binding to operator DNA (Fig. 1). This is in agreement with hydroxyl radical footprinting experiments that indicate binding of ω_2 to 5'-ATC-3' and 5'-GTG-3' in the complementary strand.¹⁸

The Raman spectra of free DNA fragments of identical base composition indicate sequence-dependent effects on the DNA conformation (Fig. 2) that might be critical for the recognition by proteins. Interestingly, the major groove of operator DNA models studied here is broader than that of DNA fragments with nonspecific sequences. This suggests a correlation with wt ω_2 binding.

With the exception of tail-to-tail diheptads, ω_2 binds with similar affinity and specificity to asymmetric DNA fragments in which, in a larger sequence context, two, three or four heptads in various orientations are embedded.¹⁸ Sequence-selective recognition by ω_2 was tested by substitution of every bp of the upstream heptad (5'-^A/TATCAC^A/T-3')

of a diheptad, whereas the downstream heptad was not modified.¹⁸ The results revealed that replacement of a bp from the pentameric central 5'-ATCAC-3' stretch reduces the binding affinity dramatically. However, substitution of the first or last bp of the heptad does not affect the binding.¹⁸ The same study has shown that the insertion of 1–7 bp between two diheptads reduces the binding affinity by 5- to 6-fold.

The Raman difference spectra of free operator DNAs (Fig. 2) indicate minor perturbations to the DNA backbone and sequence-dependent differences in stacking. Probably, the geometries of the DNA backbone in the central 5'-ATCAC-3' stretch are essential for high-affinity binding of ω_2 to operator DNA. Any changes in the pentameric central stretch of the heptad sequence would change the DNA backbone geometry, lead to a loss of specific interactions and concomitantly reduce the binding affinity to the DNA segments with modified sequence.

To gain further information about the complexity of ω_2 binding, $\omega_2\Delta N18$ variant was used to check the role of the stretch of unordered *N*-terminal amino acids¹¹ in the interaction with operator DNA. Both Arc and MetJ repressors contact the phosphate backbone with their *N*-terminal amino acids.^{7,8} In the case of ω_2 , the nearly identical Raman difference spectra of $\omega_2\Delta N18$ -fragment IV ($\rightarrow\leftarrow$) and wt ω_2 -fragment IV complexes indicate very similar modes of interaction (Fig. 4). The unordered *N*-terminal stretch of ω_2 is 27 residues long.¹¹ According to the Raman data, the 18 *N*-terminal amino acids do not interact with the DNA phosphate backbone. In addition, it has been shown that plasmid-based variants of ω_2 lacking the first 20 residues specifically repress *P δ* utilization as a unique copy in the *B. subtilis* chromosome.²¹ Therefore, the involvement of flexible first 18 *N*-terminal residues, and by extension the first 20, in the binding of wt ω_2 and operator DNA is quite unlikely. However, as in the Arc repressor,⁹ the ω_2 residues close to the β -sheet might interact with the phosphate backbone. This is consistent with the observation that ω_2 lacking the first 25 residues fails to repress *P δ* utilization *in vivo*.²¹ The stability of $\omega_2\Delta N18$ is similar to that of wt ω_2 , and DNase I footprinting showed that ω_2 or $\omega_2\Delta N18$ protein bind to operator DNA with similar efficiency,²¹ suggesting that binding affinity and cooperativity should be similar.

DNase I and chemical footprinting showed that ω_2 protein binds with comparable high affinity to diheptads in $\rightarrow\rightarrow$ and $\rightarrow\leftarrow$ orientation, $K_{d,app} \sim 20$ nM, but binds to a diheptad in the $\leftarrow\rightarrow$ orientation with ~ 6 -fold lower affinity.¹⁸ The differences between ω_2 -diheptad complexes possibly reflect different symmetries within the complexes. The Raman difference spectra of ω_2 -diheptad complexes indicate only a few differences in the interaction between ω_2 and diheptads of varying orientation (Fig. 5), but at least some differences are visible between those of ω_2 -fragment II and ω_2 -fragment IV. Perturbations in difference features of ω_2 -diheptad complexes (Fig. 5) could be caused by a different number of

contacts with adenine and thymine, and/or $\omega_2 - \omega_2$ interaction, and/or different local conformational perturbation of adenosine and thymidine. Alternatively, there is no orientation difference, with ω_2 protein interacting with the diheptads in $\rightarrow\rightarrow$, $\rightarrow\leftarrow$ or $\leftarrow\rightarrow$ orientation in a similar manner, but the off rate may be different.

Acknowledgements

This work was partially supported by an EU grant QLK3-CT-2001-00277 to JCA and HW; BMC2003-00150 from DGICYT and GR/SAL/0668/2004 from CAM to JCA; Deutsche Forschungsgemeinschaft grants GK 80/3, We 1745/5-1 and We 1745/5-2 to HW; and a grant of the Spanish Ministerio de Educación y Ciencias to HW. We thank Dr R. Misselwitz for valuable advice in the preparation of the samples.

REFERENCES

1. Babu MM, Teichmann SA. *Nucleic Acids Res.* 2003; **31**: 1234.
2. Babu MM, Teichmann SA. *Trends Genet.* 2003; **19**: 75.
3. de la Hoz AB, Ayora S, Sitkiewicz J, Fernandez S, Pankiewicz R, Alonso JC, Ceglowski P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; **97**: 728.
4. Blanco AG, Sola M, Gomis-Ruth FX, Coll M. *Structure* 2002; **10**: 701.
5. Kalivoda KA, Steenbergen SM, Vimr ER, Plumbbridge J. *J. Bacteriol.* 2003; **185**: 4806.
6. Moller-Jensen J, Borch J, Dam M, Jensen RB, Roepstorff P, Gerdes K. *Mol. Cell* 2003; **12**: 1477.
7. Somers WS, Phillips SE. *Nature* 1992; **359**: 387.
8. Raumann BE, Rould MA, Pabo CO, Sauer RT. *Nature* 1994; **367**: 754.
9. Schildbach JF, Karzai AW, Raumann BE, Sauer RT. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999; **96**: 811.
10. Gomis-Ruth FX, Sola M, Acebo P, Parraga A, Guasch A, Eritja R, Gonzalez A, Espinosa M, del Solar G, Coll M. *EMBO J.* 1998; **17**: 7404.
11. Murayama K, Orth P, de la Hoz AB, Alonso JC, Saenger W. *J. Mol. Biol.* 2001; **314**: 789.
12. Golovanov AP, Barilla D, Golovanova M, Hayes F, Lian LY. *Mol. Microbiol.* 2003; **50**: 1141.
13. Schreiter ER, Sintchak MD, Guo Y, Chivers PT, Sauer RT, Drennan CL. *Nat. Struct. Biol.* 2003; **10**: 794.
14. Popescu A, Karpay A, Israel DA, Peek RM, Krezel AM. *Proteins* 2005; **59**: 303.
15. Phillips SE, Manfield I, Parsons I, Davidson BE, Rafferty JB, Somers WS, Margarita D, Cohen GN, Saint-Girons I, Stockley PG. *Nature* 1989; **341**: 711.
16. Camacho AG, Misselwitz R, Behlke J, Ayora S, Welfle K, Meinhart A, Lara B, Saenger W, Welfle H, Alonso JC. *Biol. Chem.* 2002; **383**: 1701.
17. Meinhart A, Alonso JC, Strater N, Saenger W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; **100**: 1661.
18. de la Hoz AB, Pratto F, Misselwitz R, Speck C, Weihofen W, Welfle K, Saenger W, Welfle H, Alonso JC. *Nucleic Acids Res.* 2004; **32**: 3136.
19. Breg JN, van Opheusden JHJ, Burgering MJM, Boelens R, Kaptein R. *Nature* 1990; **346**: 586.
20. Misselwitz R, de la Hoz AB, Ayora S, Welfle K, Behlke J, Murayama K, Saenger W, Alonso JC, Welfle H. *FEBS Lett.* 2001; **505**: 436.
21. Welfle K, Pratto F, Misselwitz R, Behlke J, Alonso JC, Welfle H. *Biol. Chem.* 2005; **386**: 881.

22. Dostál L, Misselwitz R, Laettig S, Alonso JC, Welfle H. *Spectroscopy* 2003; **17**: 435.
23. Bloomfield VA, Crothers DM, Tinoco IJ. *Electronic and Vibrational Spectroscopy; in Nucleic Acids, Structures, Properties, and Functions*. University Science Books Sausalito: California, CA, 1999; 165.
24. Dostál L, Khare D, Bok J, Heinemann U, Lanka E, Welfle H. *Biochemistry* 2003; **42**: 14 476.
25. Benevides JM, Weiss MA, Thomas GJ Jr. *Biochemistry* 1991; **30**: 4381.
26. Thomas GJ Jr, Tsuboi M. *Adv. Biophys. Chem.* 1993; **3**: 1.
27. Thomas GJ Jr, Wang AH-J. *Nucleic Acids Mol. Biol.* 1988; **2**: 1.
28. Benevides JM, Chan G, Lu XJ, Olson WK, Weiss MA, Thomas GJ Jr. *Biochemistry* 2000; **39**: 537.
29. Krafft C, Hinrichs W, Orth P, Saenger W, Welfle H. Raman spectroscopic analysis of Tet repressor-operator DNA interaction in deuterium oxide. *Cell. Mol. Biol.* 1998; **44**: 239.
30. Krafft C, Hinrichs W, Orth P, Saenger W, Welfle H. *Biophys. J.* 1998; **74**: 63.
31. Dostál L, Chen CY, Wang AH, Welfle H. *Biochemistry* 2004; **43**: 9600.
32. Serban D, Benevides JM, Thomas GJ Jr. *Biochemistry* 2003; **42**: 7390.
33. Deng H, Bloomfield VA, Benevides JM, Thomas GJ Jr. *Biopolymers* 1999; **50**: 656.
34. Yoon C, Prive GG, Goodsell DS, Dickerson RE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988; **85**: 6332.
35. Overman SA, Thomas GJ Jr. *Biochemistry* 1999; **38**: 4018.
36. Overman SA, Thomas GJ Jr. *Biochemistry* 1998; **37**: 5654.
37. Benevides JM, Stow PL, Ilag LL, Incardona NL, Thomas GJ Jr. *Biochemistry* 1991; **30**: 4855.
38. Prescott B, Steinmetz W, Thomas GJ Jr. *Biopolymers* 1984; **23**: 235.
39. Benevides JM, Weiss MA, Thomas GJ Jr. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 10 869.
40. Dostál L, Misselwitz R, Welfle H. *Biochemistry* 2005; **44**: 8387.
41. Movileanu L, Benevides JM, Thomas GJ Jr. *J. Raman Spectrosc.* 1999; **30**: 637.
42. Movileanu L, Benevides JM, Thomas GJ Jr. *Biopolymers* 2002; **63**: 181.
43. Benevides JM, Weiss MA, Thomas GJ Jr. *Biochemistry* 1991; **30**: 5955.